

**Charakterisierung
Cytokin-induzierter Signaltransduktionswege:
TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 4 (TRAF4) als neuer
Ligand der p70S6 Kinase**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von
Diana Silke Fleckenstein
aus Wolfenbüttel

1. Referent: Frau Prof. Dr. B. M. Jockusch

2. Referent: Herr PD Dr. H. G. Drexler

eingereicht am: 06. 12. 2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22. 02. 2002

2002

(Druckjahr)

Ingo und meinen Eltern

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Fleckenstein DS, Uphoff CC, Drexler HG and Quentmeier H. (2001). Detection of p53 gene mutations by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines. *Leuk Res.* (im Druck).

Quentmeier H, Fleckenstein D, Zaborski M and Drexler HG. (2001). Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*. 15: 1286-1292.

Quentmeier H, Dirks WG, Fleckenstein D, Zaborski M and Drexler HG. (2000). Tumor necrosis Factor α -induced proliferation requires synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 28: 1008-1015.

Quentmeier H, Fleckenstein D, Dirks WG, Uphoff CC, Zaborski M and Drexler HG. (2001). GM-CSF is the mediator of the proliferative effect of tumor necrosis factor alpha in acute myeloid leukemia-derived cell lines. In: *Acute Leukemias IX* (ed. Hiddemann W. et al.), Springer, Berlin (im Druck).

Tagungsbeiträge:

Fleckenstein DS, Drexler HG and Quentmeier H. (2001). TRAF-4 is a new interacting partner of the p70S6K serine/threonine kinase. (Vortrag) Abstract no B13. Frühjahrstagung - Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Innsbruck, Österreich.

Quentmeier H, Fleckenstein D, Dirks W, Zaborski M and Drexler HG. (2001). GM-CSF is the mediator of the proliferative effect of TNF- α in acute myeloid leukemia-derived cell lines. (Poster) 80, Suppl. II 35. *Annals of Hematology*, München.

Weitere Veröffentlichungen:

Fleckenstein D, Rohde M, Klionsky DJ and Rüdiger M. (1998). Yel013p (Vac8p), an armadillo repeat protein related to plakoglobin and importin α , is associated with the yeast vacuole membrane. *J. Cell. Sci.* 111: 3109-18.

Rüdiger M and Fleckenstein D. (1998). Yeast Plakoglobin (Yel013p) is a Vacuolar Membrane Protein. (Poster) *Eur. J. Cell. Biol.* 75, Suppl. 48: Abstract no 44, 172. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Saarbrücken.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
I EINLEITUNG	1
1 Das hämatopoietische System	1
2 Cytokine und Rezeptoren	3
3 Signaltransduktionen	5
3.1 Die MAPK-Signaltransduktionskaskaden	7
3.2 Der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg	9
3.3 JAKs und STATs	10
4 p53 und seine Rolle bei Cytokin-abhängiger Proliferation	12
5 Zielsetzung und Aufgabenstellung	13
II MATERIAL UND METHODEN	14
1 Material	14
1.1 Chemikalien und Enzyme	14
1.2 Bakterien	14
1.3 Hefen	14
1.4 Zelllinien	16
1.5 Vektoren	16
1.6 Oligodesoxynukleotide	17
1.7 Antikörper	19
1.8 Cytokine und Inhibitoren	20
1.9 Geräte	22
2 Methoden	24
2.1 Molekularbiologische Methoden	24
2.1.1 DNA-Präparation	24
2.1.1.1 Präparation hochmolekularer (HMW) DNA aus eukaryontischen Zellen	24
2.1.1.2 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab aus <i>E.coli</i>	24
2.1.1.3 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab aus <i>E.coli</i>	25
2.1.2 RNA-Präparation	25
2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.1.4 DNA-Fragmentisolierung mit <i>Jetsorb</i>	26
2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.1.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	27
2.1.7 Dephosphorylierung von endständigen 5'-Phosphatresten	27
2.1.8 Auffüllreaktion 5'-überstehender Enden (Klenow-Reaktion)	27

2.1.9	T4 DNA-Polymerase-Reaktion zur Herstellung von „blunt-ends“	28
2.1.10	Phenol-Extraktion	28
2.1.11	Ethanol-Präzipitation	29
2.1.12	<i>In vitro</i> -Neukombination von DNA-Fragmenten	29
2.1.13	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	30
2.1.14	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.1.14.1	Klonanalyse mittels PCR	31
2.1.15	cDNA Synthese mittels reverser Transkription	32
2.1.16	„Single Strand Conformational Polymorphism“ (SSCP)	33
2.1.17	DNA-Sequenzierung	34
2.1.18	„Yeast Two-Hybrid“-System	35
2.1.18.1	Herstellung kompetenter Hefezellen	35
2.1.18.2	Transformation von Hefen	36
2.1.18.3	β -Galaktosidase-Filterassay	36
2.1.18.4	Plasmidisolierung aus Hefen	37
2.1.19	Radioaktive Markierung von DNA	38
2.1.19.1	„Random-primed Oligolabeling“	38
2.1.19.2	Abtrennung freier Nukleotide	38
2.1.19.3	Bestimmung der radioaktiven Einbaurate durch Trichlor- essigsäure- (TCA) Fällung	39
2.1.20	Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen	39
2.1.20.1	Southern-Blot	39
2.1.20.2	Northern-Blot	40
2.1.20.3	Kolonie-Filter-Hybridisierung	41
2.1.20.4	Filterhybridisierung	42
2.1.21	Gel-Shift	42
2.2	Mikrobiologische Methoden	43
2.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	44
2.3	Biochemische Methoden	44
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.3.2	Immunoblot	46
2.3.3	Coimmunpräzipitation	47
2.3.4	Immunpräzipitation unter nativen Zell-Lyse Bedingungen	48
2.3.5	<i>in vitro</i> Transkription und Translation von Proteinen	48
2.3.6	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	49
2.4	Zellkulturtechnik	50
2.4.1	Verwendete Zelllinien	50
2.4.2	Kultivierung von Zelllinien	51
2.4.3	Passagieren	51
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl und Lebensfähigkeit	52

2.4.5	Cryokonservierung von Zellen	53
2.4.6	Auftauen von Zellen	53
2.5	Zellbiologische Methoden	54
2.5.1	Zellzyklus-Analyse mit Propidiumiodid	54
2.5.2	[³ H]-Thymidin-Assay	54
2.5.3	Annexin V Apoptose-Assay	55
2.5.4	Transiente Transfektion	56
2.5.5	Stabile Transfektion	57
2.5.6	Herstellung von Zell- und Kernextrakten	57
2.5.7	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	58
2.5.7.1	Paraformaldehyd-Fixierung und Triton-Permeabilisierung	58
2.5.7.2	Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol	59
2.5.8	Indirekte Immunfluoreszenz	59
III	ERGEBNISSE	60
1	Detektion von p53 Mutationen in humanen AML-Zelllinien	60
1.1	Erstellung eines Expressionsprofils von wt oder mut p53 Protein in AML-Zelllinien	61
1.2	SSCP-Analyse zeigt Veränderungen des p53 Gens in verschiedenen AML-Zelllinien	62
1.3	p53 Mutationen kommen in Cytokin-abhängig und -unabhängig wachsenden AML-Zelllinien vor	66
2	Einfluß Cytokin-induzierter Signaltransduktion auf proliferative Prozesse hämatopoietischer Zellen	67
2.1	Spezifitätsanalyse von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege	67
2.2	Bestimmung des Aktivierungszeitpunktes der MAPK (Erk-1,2) und der p70S6K	70
2.3	Einfluß von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege auf die Proliferation myeloischer Zellen	73
2.4	Der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt anti-apoptotische Signale	76
2.5	Stimulation mit Cytokinen, die an Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie und Rezeptortyrosinkinasen binden	77
3	Identifizierung der Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4	81
3.1	Klonierung der p70S6K und Konstruktion des „Yeast Two-Hybrid“-Vektors	82
3.2	„Yeast Two-Hybrid“-Screening einer Hela cDNA Bank	83
3.3	Konstruktion eines Expressionsvektors für p70S6K und TRAF4	84
3.4	<i>in vitro</i> Transkription und Translation von p70S6K und TRAF4	85
3.5	TRAF4 Immunpräzipitation nach <i>in situ</i> Crosslinking	86

3.6	Expression von TRAF4 in Zellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs	89
3.7	Lokalisationsstudien von p70S6K/TRAF4 in HEK-293 Zellen	92
4	Funktionsanalyse der p70S6K/TRAF4 Interaktion in HEK-293 Zellen	93
4.1	TNF- α aktiviert die p70S6K in TRAF4-positiven, nicht aber in TRAF4-negativen Zellen	93
IV DISKUSSION		98
1	p53 als Mediator Cytokin-unabhängiger Proliferation?	98
2	Die PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion hat eine zentrale Funktion bei der Proliferation myeloischer Zellen	100
2.1	Cytokin-stimulierte Signaltransduktion: Proliferation oder anti-Apoptose?	102
3	TRAF4 als neuer Ligand der p70S6K	103
4	Gibt es einen „Cross Talk“ zwischen der TNF-Rezeptor- und der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion?	107
V LITERATURVERZEICHNIS		111
Anhang		120
Danksagung		
Lebenslauf		

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AB	engl. Antikörper
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphocytäre Leukämie
AML	Akute myelocytäre Leukämie
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	engl. Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Temperatur in Celsius
cfu	colony forming units
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	counts per minute
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	engl. fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GBF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung
GFP	Green fluorescence protein
h	engl. Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[Ethansulfonsäure]
HMW	High molecular weight marker
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MOPS	3-(N-morpholino-)Propansulfonsäure
mut	Mutation
N-Terminus	Amino-Terminus
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus [H ⁺]
PI	Proteaseinhibitoren
PIPES	Piperazin-N, N'-bis (2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	engl. Natriumdodecylsulfat
SI	Stimulationsindex
SSC	Standard Saline Citrate
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA

TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
UV	Ultraviolette Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indoyl-β-D-galaktosid

ZUSAMMENFASSUNG

Cytokin-induzierte Signaltransduktionen sind maßgeblich an proliferativen sowie apoptotischen Prozessen hämatopoietischer Zellen beteiligt. Eine besondere Funktion für die Proliferation wird den Ras/Raf/MAPK-, PI-3K/p70S6K- und den JAK/STAT-Signaltransduktionswegen zugeordnet. Neben diesen Wegen vermittelt auch das Tumorsuppressorprotein p53 Signale, die regulativ in Wachstums- und Apoptoseprozesse eingreifen. Trotz umfangreicher Kenntnisse über die einzelnen Glieder dieser Signaltransduktionswege ist ihre Bedeutung für Wachstum und Überleben für myeloische Zellen bislang noch weitgehend ungeklärt. Einige der Zelllinien, die von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) etabliert wurden, wachsen Cytokin-abhängig, eine Eigenschaft, die sie für Untersuchungen proliferativer Prozesse prädestiniert. Bei diesen Zellen sind Wachstumsreduktion und einsetzende Apoptose nach Cytokinentzug sehr gut nachweisbar.

Um die Hypothese, dass p53 für Cytokin-induzierte Wachstumsprozesse obligatorisch ist, zu stützen, sollte zunächst im Rahmen dieser Arbeit der p53 Status Cytokin-abhängiger Zellen mit dem -unabhängiger Zellen verglichen werden. Dabei konnten keine p53 Mutationen explizit in Cytokin-unabhängigen Linien festgestellt werden, auch Cytokin-abhängige Zellen wiesen Mutationen im p53 Gen auf. Mit Hilfe der SSCP-Analyse wurden neue p53 Mutationen in fünf sowohl Cytokin-abhängig als auch -unabhängig wachsenden AML-Linien detektiert.

Versuche mit spezifischen Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege zeigen, dass der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg neben anti-apoptotischer Prozesse auch an der Zellteilung beteiligt ist. Wichtiger für die Proliferation myeloischer Zellen ist jedoch der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg. Da sich während dieser Arbeit herausstellte, dass die p70S6K als zentraler Mediator proliferativer aber auch anti-apoptotischer Prozesse angesehen werden kann, sollte sie das Ziel weiterer Analysen werden. Für AML-Zellen konnte eine Lokalisation der p70S6K im Cytoplasma und bei Cytokin-stimulierten Zellen im Kern mittels Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden. Die Verteilung der Kinase auf diese beiden Zellkompartimente bestätigt bereits aus der Literatur bekannte Daten. Die aktivierte p70S6K phosphoryliert das an Ribosomen lokalisierte S6 Protein und greift so in die Translationsregulation und indirekt, über Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F in die Transkription ein. Die Verteilung der

p70S6K auf die beiden oben genannten Zellkompartimente sowie die Beteiligung an der Translations-/Transkriptionskontrolle ließen vermuten, dass diese Kinase neben dem ribosomalen S6 Protein noch weitere Interaktionspartner hat. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Hela cDNA-Genexpressionsbank im „*Yeast Two-Hybrid*“-System gescreent. Dabei konnte TRAF4 (Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 4) als neuer Ligand der p70S6K identifiziert werden. Mit der Herstellung von Expressionsplasmiden und Transfer in humane Zellen wurde die im Hefesystem detektierte Interaktion biochemisch durch Coimmunpräzipitationen bestätigt. Zusätzliche Coimmunpräzipitationen endogener Proteine in den Zelllinien Hela und TF-1 schlossen aus, dass diese Interaktion ein durch Überexpression ausgelöstes Phänomen ist. Aus funktionalen Analysen wurde deutlich, dass HEK-293 Zellen, die kein endogenes TRAF4 exprimieren, nicht durch TNF- α stimulierbar waren, während dies für transfizierte Zellen zutrifft. TNF- α Stimulation führte in diesen Zellen zur Aktivierung der p70S6K und anschließender Phosphorylierung von S6. Damit wurde gezeigt, dass vom TNF-Rezeptor ausgehende Signale über TRAF4 zur Aktivierung der p70S6K führen. Die p70S6K/TRAF4-Interaktion stellt demnach eine neue Verbindung zwischen zwei bisher voneinander unabhängigen Signaltransduktionswegen her.

Die Identifikation weiterer „upstream“ von TRAF4 lokalisierter Proteine, könnte zum besseren Verständnis der vom TNF-Rezeptor ausgehenden Signaltransduktion beitragen.

I EINLEITUNG

1 Das hämatopoietische System

Das Blut besteht aus Zellen und einer wässrigen Lösung, dem Plasma, dessen Bestandteile wesentliche Funktionen in der Gerinnung und der Immunabwehr haben. Die einzelnen Zelltypen haben unterschiedlichste Aufgaben, begonnen beim Sauerstofftransport bis hin zur Antikörperproduktion. Einige dieser Zellen bleiben ausschließlich innerhalb dieses Gefäßsystems, andere nutzen es als Transportmittel, um an die Orte ihrer Funktion zu gelangen. Alle Blutzellen haben eine begrenzte Lebensdauer und unterliegen einem kontinuierlichen Erneuerungsprozeß. Außerdem sind sie gleichen Ursprungs, d.h. sie stammen von einer gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark ab (siehe Abb. I. 1). Diese hämatopoietische Stammzelle ist pluripotent, da alle ausdifferenzierten Blutzellen über einen Reifungsprozeß aus ihr entstehen können (Golde, 1991).

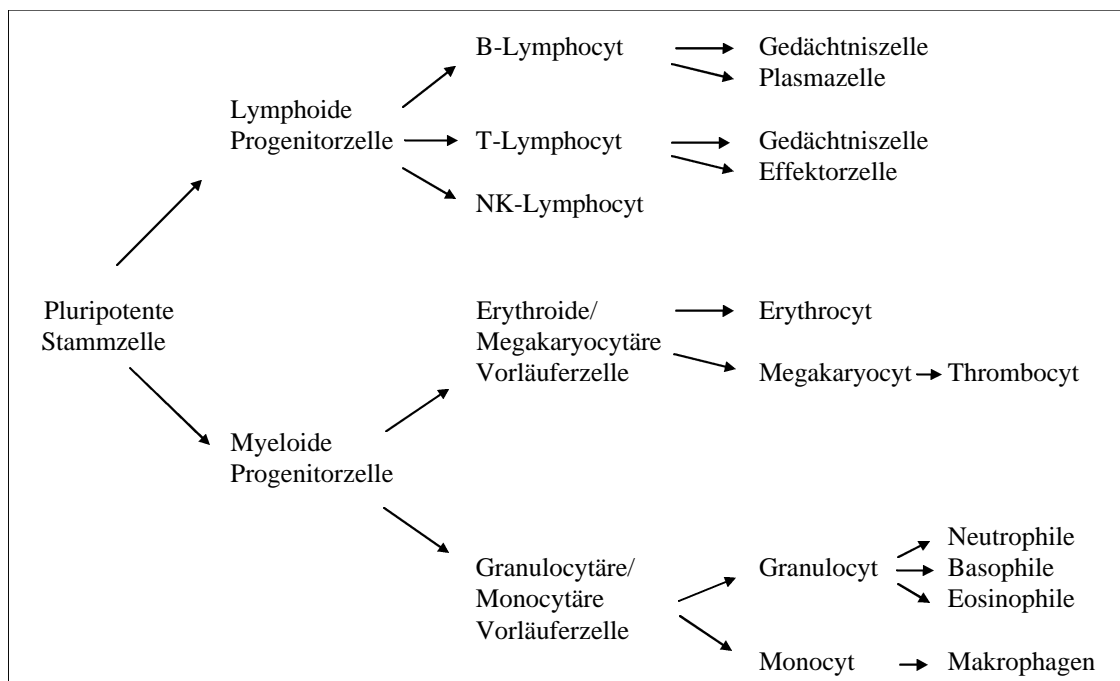


Abb. I. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoiese. Die pluripotente Stammzelle teilt sich selten und erzeugt entweder weitere pluripotente Stammzellen oder festgelegte Progenitor-Zellen. Aus den lymphoiden Progenitorzellen entstehen B- und T-Zellen sowie NK-Zellen, die von spezifischen Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt werden und zu B-Gedächtnis- und Plasmazellen bzw. zu T-Gedächtnis- und Effektorzellen reifen. Aus dem myeloiden Progenitor entstehen die erythroiden/megakaryocytaire und granulocytaire/monocytaire Vorläuferzellen, die schließlich zu den Blutzellen ausreifen.

Zunächst entwickeln sich determinierte Progenitorzellen, noch unreife Vorläuferzellen der einzelnen Differenzierungsreihen. Die endgültig differenzierten Zellen haben zum Teil die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren (Dexter & Spooncer, 1987). Aus der lymphoiden Reihe gehen die B-, NK- und T-Zellen hervor, deren Aufgaben in der Immunabwehr liegen. Im folgenden Abschnitt wird auf die Zellen der myeloischen Reihe näher eingegangen. Aus der myeloiden Progenitorzelle entwickeln sich die Vorläuferzellen der Erythrocyten und Megakaryocyten, sowie die der Granulocyten/Monocyten. Die erythroiden und megakaryocytären Vorläuferzellen entstehen vermutlich auch aus einer einzigen, bipotenten Progenitorzelle, da deren weitere Differenzierung nur auf eine Zellreihe determiniert ist (Debili et al., 1996).

Die Erythrocyten sind der häufigste Zelltyp im Blut. Während der Reifung aus der erythroiden Vorläuferzelle gehen Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Ribosomen verloren. Der reife Erythrocyt kann deshalb nicht wachsen und sich auch nicht mehr teilen. Die mit Hämoglobin ausgestatteten Zellen bleiben im Blut und übernehmen die Sauerstoffversorgung des Organismus, sowie den Abtransport von Kohlendioxid. Die Megakaryocyten entstehen aus den megakaryocytären Vorläuferzellen. Eines der auffälligsten Merkmale neben seiner Größe ist der stark polyploide Kern. Durch Abschnürung des Cytoplasmas entstehen die kernlosen Thrombocyten. Sie werden mit dem Blut weggeschwemmt, heften sich spezifisch an die Endothelauskleidung beschädigter Blutgefäße und helfen bei der Blutgerinnung.

Granulocyten und Monocyten entwickeln sich aus ihrer gemeinsamen Vorläuferzelle. Alle Granulocyten enthalten zahlreiche Lysosomen und sekretorische Vesikel und lassen sich anhand ihrer Morphologie in drei Klassen einteilen. *Neutrophile* sind der am weitesten verbreitete Granulocytentyp. Sie werden vom Blutstrom an ihren Funktionsort befördert, verlassen dort das Gefäßsystem und dringen in das Gewebe ein, wo sie für die bakterielle Abwehr durch Phagocytose sorgen. *Basophile* machen zahlenmäßig den geringsten Anteil an Granulocyten aus. Sie scheiden Histamin, Serotonin und Heparin aus, vermitteln damit Entzündungsreaktionen, sind aber auch an der Blutgerinnung beteiligt (Agis et al., 1996). In ihrer Funktion ähneln sie stark den im Bindegewebe lokalisierten Mastzellen. *Eosinophile* haben ihre Hauptaufgabe in der Bekämpfung von Parasiten und modulieren allergische Entzündungsprozesse.

Monocyten verlassen das Knochenmark und verbleiben zunächst im Blut, bis sie in das Gewebe eindringen und zu Makrophagen differenzieren (Ziegler-Heitbrock, 1989). Diese zirkulieren durch den Körper und phagocytieren gefundene Antigene. Nach anschließender Prozessierung werden die Peptide mit Molekülen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) verbunden und auf der Zelloberfläche für die Immunantwort präsentiert (Roitt et al., 1993).

2 Cytokine und Rezeptoren

Hämatopoietische Cytokine sind Botenstoffe, die bei Entzündungen, Immunantworten und anderen gewebespezifischen Prozessen nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor eine Änderung der Physiologie der Zelle, der Genexpression bzw. des Wachstumsstatus bewirken.

Meist handelt es sich um lösliche oder über Disulfidbrücken verknüpfte Glycoproteine, die entweder N- oder O-glycosyliert sind und sich durch eine besondere Stabilität auszeichnen. Durch die Glycosylierung bleiben sie löslich und sind vor dem Abbau durch Proteasen geschützt (Nicola, 1989). Sie werden von Leukocyten produziert und meistens sezerniert, einige können aber auch an der Zellmembran lokal exprimiert werden, wie der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF) (Schulze-Osthoff et al., 1994). Sie dienen als Signalmoleküle, die die Kommunikation zwischen Zellen ermöglichen.

Die Hauptaufgabe der Cytokine liegt in der Aktivierung von im Cytoplasma lokalisierten Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, oder Phosphorylierung von „downstream“ des Rezeptors lokalisierten Signalproteinen, wie der Kinase Akt/PKB oder der p70S6K. Die spezifische Expression von Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren ermöglicht der Zelle, höchst präzise auf Signaländerungen zu reagieren. Da es in vielen Fällen Blutzellen sind, die den Cytokinen als primäres Ziel dienen, werden diese zur hämatopoietischen Cytokin-Familie zusammengefaßt. Zu dieser Familie zählen die Interleukine (IL) und verwandte Moleküle wie der Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF). Die Zellen sind in der Lage, die Kontrolle der Cytokin-Funktion über das sogenannte „Processing“ zu steuern, indem Cytokine posttranslational modifiziert werden. *In vitro* können Cytokine in nano- und picomolaren Konzentrationen das Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten von Zellen beeinflussen.

Cytokine binden an spezifische Rezeptoren, wie Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder Mitglieder der Cytokinrezeptor-Superfamilie. Die Rezeptoren bestehen meist aus drei Domänen. Einer extrazellulären, die die Bindungsstelle für Cytokine enthält, einer kurzen transmembranen, die sich durch hydrophobe Aminosäuren auszeichnet, um membrangängig zu sein, und einer intrazellulären Domäne, die in Verbindung mit den Signaltransduktionsmolekülen steht. Die RTK-Familie unterscheidet sich hauptsächlich durch ihre Tyrosinkinase-Domäne von anderen Rezeptorklassen. Aufgrund ihrer strukturellen Charakteristika läßt sich die RTK-Familie in Subfamilien unterteilen. Eine dieser Familien ist die PDGF-Rezeptor-Familie, die sich durch 5 extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen auszeichnet. Diese Rezeptoren lassen sich durch Cytokine, wie FLT3-L („fetal liver tyrosine kinase 3-ligand“), M-CSF („macrophage-colony stimulating factor“) oder SCF („stem cell factor“) aktivieren (Heldin, 1995).

Bei den meisten Wachstumsfaktoren, die an die RTK-Familie binden, handelt es sich um Dimere, wie PDGF („platelet-derived growth factor“). Sie binden an zwei Rezeptoren gleichzeitig, was zur Dimerisierung der Rezeptoren führt (siehe Abbildung I. 2). Infolge dieser Dimerisierung kommt es zur Autophosphorylierung, wobei jeder einzelne Rezeptor den jeweiligen Partner phosphoryliert. Die Phosphotyrosinreste bilden die Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine, die SH2- oder andere Phosphotyrosin-bindende (PTB)-Domänen enthalten. Die regulatorische Untereinheit (p85) der PI-3 Kinase (PI-3K) ist ein Beispiel dafür, wie Proteine über ihre SH2 Domänen an tyrosinphosphorylierte RTK binden (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

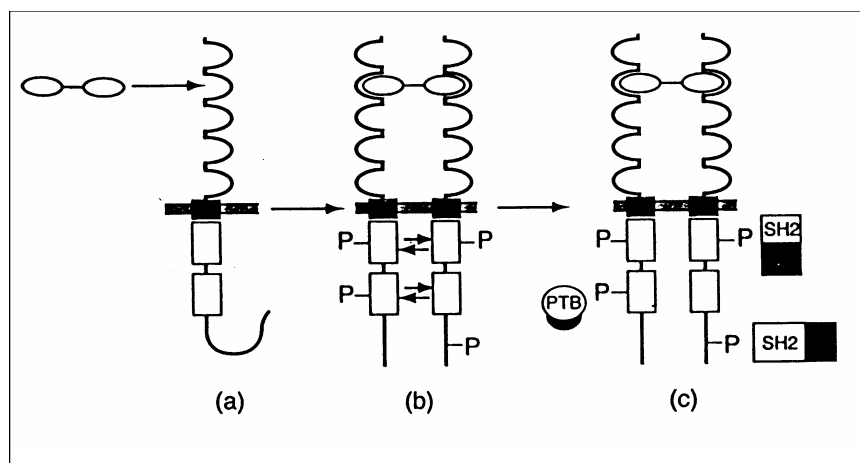


Abb. I. 2: Schematische Darstellung der Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen. a) Ligandenbindung an den Rezeptor, b) Dimerisierung zweier Rezeptoren und Autophosphorylierung; c) Phosphorylierung von SH2 und PTB Domänen intrazellulärer Proteine. P = Phosphorylierte Tyrosinreste.

Die Cytokinrezeptor-Superfamilie lässt sich in zwei Gruppen einteilen, die sich aufgrund von Aminosäure-Homologien in der extrazellulären Domäne klassifizieren lassen. Die Cytokinrezeptor-Superfamilie der Klasse I lässt sich in vier Subfamilien unterteilen, die als GH- („growth hormone“), IL-2-, IL-3- und IL-6-Rezeptor-Familien bezeichnet werden. Mitglieder der IL-3-Rezeptor-Familie (IL-3R) sind der IL-3R, der IL-5R und der GM-CSFR. Diese Rezeptoren setzen sich aus einer allen gemeinsamen gp140 β_c -Untereinheit und einer ligandenspezifischen α -Untereinheit zusammen. Nach Ligandenbindung an die α -Untereinheit komplexieren die α - und β -Untereinheiten miteinander, was zur Aktivierung des Rezeptors führt (Ihle et al., 1995).

Auf die anderen Subfamilien und die Cytokinrezeptor-Superfamilie der Klasse II, zu der die Interferon Rezeptoren und der IL-10R gehören, soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit waren. Nach Cytokin-Stimulation kommt es ähnlich wie bei den Rezeptortyrosinkinasen zur Homo- bzw. Heterodimerisierung der Rezeptoren. Dies führt zur Tyrosinphosphorylierung der Rezeptoren sowie rekrutierter Signalproteine, wie Janus-Kinasen (JAK) (Miyajima et al., 1992; Taga & Kishimoto, 1992).

3 Signaltransduktionen

Unter Signaltransduktion versteht man im allgemeinen die Weiterleitung eines von außen auf die Zelle einwirkenden Signals an den Kern oder die Ribosomen. Dies geschieht über ein kompliziertes intrazelluläres Netzwerk, das aus Kinasen und Phosphatasen besteht. Transkriptionsfaktoren erhalten entweder das Signal zur Translokation vom Cytoplasma in den Kern oder werden direkt im Kern aktiviert. Als Beispiel für inaktiv im Cytoplasma vorliegende Transkriptionsfaktoren sei NF- κ B erwähnt, der nach Phosphorylierung und Inaktivierung seines Inhibitors I κ B in den Kern wechselt. Im Nukleus initiieren diese Faktoren die Transkription bestimmter Gene, was dazu führt, dass die Zelle letztendlich auf das eingetroffene Signal antworten kann.

Neben der Transkription wird auch die Translation durch Signaltransduktionen reguliert. Diese Kontrolle übernehmen verschiedene Signaltransduktionswege, an denen diverse Kinasen, wie die PI-3K, die MAP Kinasen (MAPK), die Proteinkinase C (PKC), die p70S6 Kinase (p70S6K), Frap/mTOR und weitere beteiligt sind (siehe Abbildung I. 3).

Verschiedene parallel verlaufende und vernetzte Kinasekaskaden beeinflussen die Translation entweder positiv oder negativ durch Phosphorylierung ribosomaler Proteine, wie das S6 Protein.

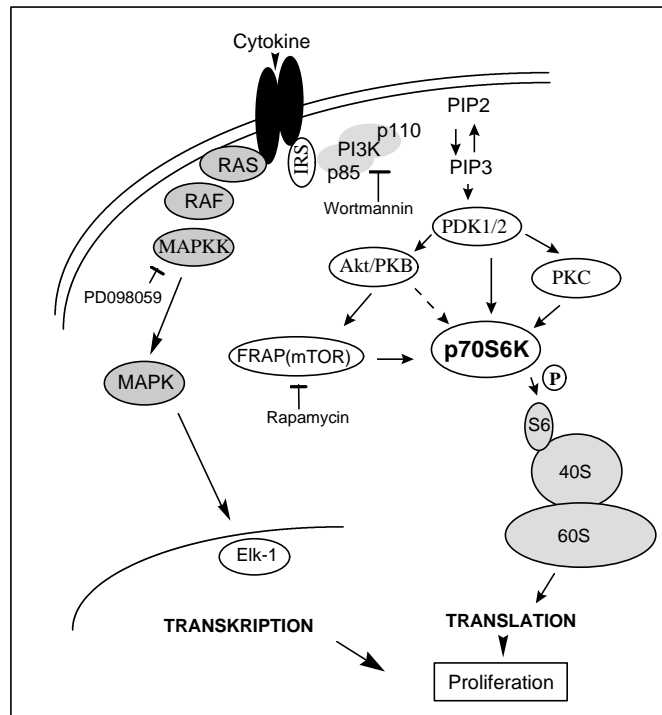


Abb. I. 3: Schematische Darstellung der Ras/Raf/MAPK- und PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionswege zur Transkriptions- bzw. Translationskontrolle.

Jede Zelle eines vielzelligen Organismus ist in seiner Umgebung einer Vielzahl unterschiedlicher Signale ausgesetzt. Die Wirkungsweise einzelner Cytokine kann sehr variabel sein, je nachdem ob und wie die Zelle noch zusätzlich stimuliert wird. Zudem hängt die Antwort einer Zelle auf ein Signal auch vom gewebetypischen Expressionsmuster ab. Jede Zelle muß also gemäß ihrer Entwicklung selektiv auf diese Signale reagieren. Dabei halten eukaryontische Zellen die Balance zwischen Überleben und Sterben aufrecht. Desweiteren unterliegt die Cytokin-Produktion einer ständigen Kontrolle, um in Wachstums- oder Differenzierungsprozesse eingreifen zu können. Ist das Gleichgewicht durch Fehlen eines dieser Signale gestört, leitet die Zelle einen Selbstmordprozeß (Apoptose) ein. Die Zelle muß also in der Lage sein, die zur Verfügung stehenden Wachstums- und Überlebensfaktoren zu erkennen und von den sogenannten Tötungssignalen wie TNF oder FasL zu unterscheiden (Schulze-Osthoff et

al., 1994). Abweichungen in der Signalstärke, die das empfindliche Verhältnis von Überleben/Apoptose beeinträchtigen, sollen zu neurodegenerativen Erkrankungen oder auch zur Entstehung von Krebs führen (Thompson, 1995).

In den folgenden drei Abschnitten sollen die Signaltransduktionswege, die in dieser Arbeit für Untersuchungen proliferativer Prozesse in Betracht gezogen wurden, näher beschrieben werden.

3.1 Die MAPK-Signaltransduktionskaskaden

Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen sind an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt, wie der Proliferation, der Differenzierung und dem Zelltod. Diese Prozesse sind für die Entwicklung und Funktion von Blutzellen von entscheidender Bedeutung. Die MAP Kinasen der Mammalia lassen sich in 3 Hauptgruppen einteilen. In die extrazellulär Signal-regulierten Proteinkinasen (p42/p44-ERK) (Schaeffer & Weber, 1999), die p38 MAP Kinasen (Han & Ulevitch, 1999) und die c-Jun NH₂-terminale Kinasen (JNK) (Davis, 2000). Die Abbildung I. 4 stellt eine Übersicht der einzelnen MAP Kinase Signaltransduktionswege dar.

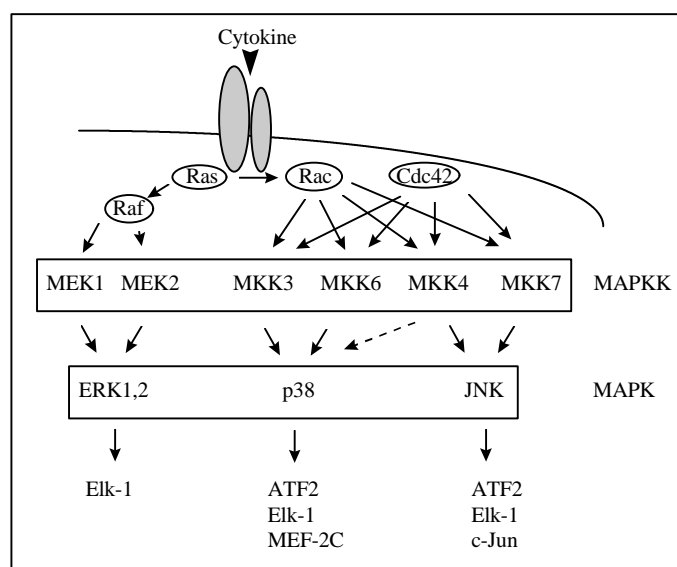


Abb. I. 4: Schematische Darstellung der 3 MAP-Kinase Signaltransduktionswege.

Diese MAPK lassen sich durch Phosphorylierung an dem Tripeptid-Motiv Thr-Xaa-Tyr aktivieren. Die Sequenz dieses Motives unterscheidet sich bei den einzelnen Gruppen von MAPK: ERK (Thr-Glu-Tyr); p38 (Thr-Gly-Tyr) und JNK (Thr-Pro-Tyr). Diese doppelte Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Reste wird durch eine entwicklungsgeschichtlich konservierte Proteinkinasekaskade vermittelt. Die ERK MAP Kinasen werden durch die MAP Kinase Kinasen (MKK)1 und MKK2 aktiviert, die p38 MAP Kinasen durch MKK3, MKK4 und MKK6, der JNK Pathway wird schließlich durch MKK4 und MKK7 aktiviert (Rincon et al., 2001). Die MAP Kinase Kinasen werden wiederum durch die MAP Kinase Kinase Kinasen (MAPKKK) aktiviert. Verschiedene „upstream“ eintreffende Signale können zur Aktivierung der MAPKKK führen.

Die Familie der „kleinen GTPasen“, zu denen auch Ras gehört, spielt hierbei eine große Rolle. Charakteristisch für die kleinen GTPasen ist der Wechsel zwischen einer aktiven Form, bei der GTP gebunden wird, und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form. Der Übergang zwischen diesen beiden Aktivitätszuständen wird durch verschiedene im Cytoplasma lokalisierte Nukleotid-Austauscher („guanine nucleotide exchange factors“, GNEFs), GTPase aktivierende Proteine („GTPase activating proteins“, GAPs) und Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren herbeigeführt. Die Menge an aktivem Ras-GTP wird durch die sogenannten GNEFs reguliert, während die GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren und das aktivierte Ras wieder in den inaktiven Zustand versetzen (Adjei et al., 2001). Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren beeinflussen ebenfalls das Gleichgewicht zwischen den beiden Aktivitätszuständen, indem sie die Dissoziation des gebundenen GDPs herabsetzen und dadurch den inaktiven Konformationszustand begünstigen (Boguski & McCormick, 1993; Buday & Downward, 1993).

Als aktiviertes G-Protein ist Ras in der Lage, die Serin/Threonin Kinase Raf an die Plasmamembran zu rekrutieren, wo Raf durch einen bisher unbekannten Faktor aktiviert wird (Stockoe et al., 1994; Tamada et al., 1997). Einmal aktiviertes Raf phosphoryliert MEK, das wiederum phosphoryliert ERK1,2. Der ERK1,2-Signaltransduktionsweg kann demnach durch Ras über die Raf Gruppe von MAPKKK aktiviert werden. Die p38 und JNK MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskaden werden durch die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 der Rho-Familie aktiviert (Rincon et al., 2001).

3.2 Der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg

Der PI-3K/p70S6K Signaltransduktionsweg ist an der Regulation von Überleben, Wachstum und Proliferation beteiligt (Vanhaesebroeck & Alessi, 2000; Schmelzle & Hall, 2000). PI-3 Kinasen gehören zur Familie der Lipidkinasen, die sich durch ihre Fähigkeit, die 3'OH-Gruppe des Inositolringes in Inositol-Phospholipiden zu phosphorylieren, auszeichnen. PI-3K bilden Heterodimere, die aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85) bestehen. Bindung der p85 Untereinheit über SH2-Domänen an einen Rezeptor führt zur Aktivierung der PI-3K. Ebenfalls kann die direkte Bindung von Ras-GTP an p110 zur Produktion von Polyphosphoinositiden führen. Diese binden an Pleckstrin-homologe (PH) Domänen von Proteinen, die die Signaltransduktion vermitteln. Phosphoinositid-bindende PH-Domänen wurden für eine ganze Anzahl von Proteinen beschrieben, wie die Serin/Threonin-Kinasen, 3'-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK-1) und Akt/Protein-Kinase B (PKB) (Blume-Jensen & Hunter 2001). Die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen führt zur Produktion von Phosphoinositiden an der Membranninnenseite (siehe Abbildung I. 5).

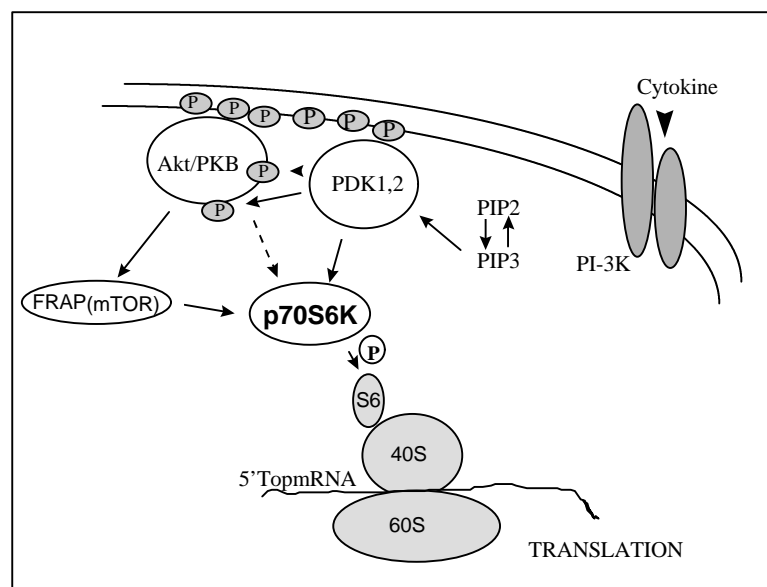


Abb. I. 5: Vereinfachte schematische Darstellung der p70S6K Aktivierung.

Akt/PKB interagiert mit diesen Phospholipiden, was zur Rekrutierung dieser Kinase an die Membran führt. Dort ist die PDK-1 lokalisiert, die sowohl Akt/PKB als auch die

p70S6K phosphoryliert. Die Bindung von Akt/PKB an 3'-Phosphoinositide scheint eine Konformationsänderung dieser Kinase zu bewirken, wobei die beiden Phosphorylierungsstellen exponiert werden (Alessi et al., 1996).

Die p70S6K wird nach Aktivierung der PI-3K sowohl durch PDK-1 als auch durch FRAP/mTOR an Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert. Die aktivierte p70S6K phosphoryliert das ribosomale S6 Protein, das an der kleineren 40 S Untereinheit lokalisiert ist. S6 reguliert die Translation durch Kontrolle der 5'-TOPmRNA (Oligopyrimidin-Abschnitt am 5'-Transkriptionsstartpunkt). Diese mRNAs kodieren primär für ribosomale Proteine und für weitere in der Translationsmaschinerie benötigten Komponenten (Dufner & Thomas, 1999).

3.3 JAKs und STATs

Die Familie der Janus Tyrosinkinasen (JAKs) umfaßt in Säuger-Zellen bis jetzt 4 Mitglieder, nämlich JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2. Alle JAKs enthalten 2 Kinase-homologe Domänen (JH1 und JH2). Die C-terminale Domäne JH1 ist die katalytisch aktive, während die JH2 Domäne aufgrund ihrer Sequenzhomologien, als Kinase-ähnliche Domäne bezeichnet wird. JAKs sind „downstream“ der Cytokin-Rezeptoren und der Rezeptortyrosinkinasen lokalisiert und vermitteln die Übertragung eintreffender Signale (Ihle & Kehr, 1995; Ihle et al., 1997).

Die STAT-Proteine enthalten hoch konservierte Bereiche, wie die SH2-Domäne, eine SH3-Domäne sowie einen konservierten Tyrosin-Rest am C-Terminus der SH2-Domäne. SH2-Domänen binden Phosphotyrosine, während SH3-Domänen Bindungsstellen für Prolin-reiche Motive enthalten. Alle sieben bisher bekannten STATs fungieren als Transkriptionsfaktoren (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

Eine Vielzahl von Liganden, wie Hormone, Cytokine inklusive einer speziellen Subgruppe von Cytokinen, die Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter, können zur Aktivierung der JAKs führen (Ihle et al., 1994). Ligandenbindung bewirkt eine Rezeptor-Aggregation, die wiederum zur Aktivierung der JAKs durch Autophosphorylierung führt. Die aktivierten JAKs phosphorylieren assoziierte Rezeptoren, STAT Moleküle und weitere nachfolgende, signalvermittelnde Proteine (Darnell et al., 1994; Leonard & O'Shea, 1998).

Die Phosphorylierung der STATs führt daraufhin zur Dimerisierung über ihre SH2-Domänen (siehe Abbildung I. 6).

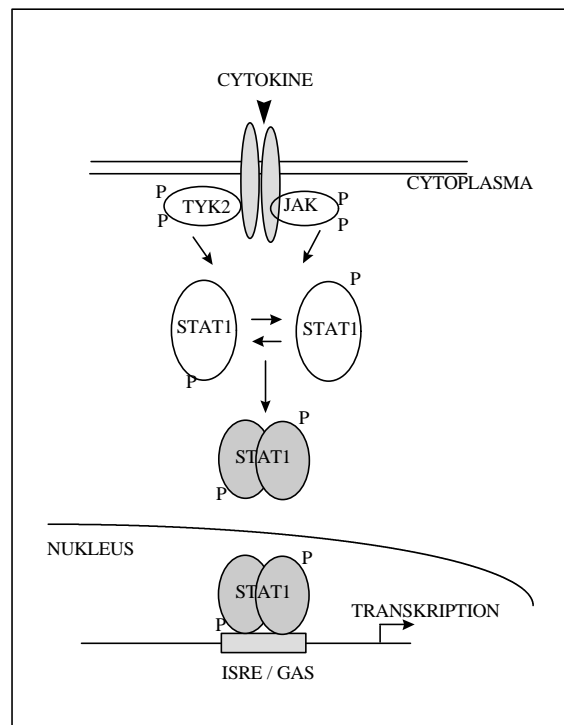


Abb. I. 6: Schematische Darstellung der STAT Phosphorylierung durch JAK.

Anschließend trennen sich die STAT-Dimere vom Rezeptor und translokieren in den Kern. Dort binden sie an IRE („interferon response element“) und GAS („gamma interferon-activated sequence“), definierte DNA-Bindestellen und aktivieren die Transkription bestimmter Gene (Darnell et al., 1994; Leonard and O’Shea 1998). Die durch Ligandenbindung verursachte Tyrosin-Phosphorylierung der STATs ist ein transients und sorgfältig kontrollierter Prozeß, der für einige Minuten, aber auch bis zu mehreren Stunden aufrechterhalten bleiben kann (Bowman et al., 2000).

4 p53 und seine Rolle bei Cytokin-abhängiger Proliferation

p53 ist ein Tumorsuppressorprotein, das eine zentrale Funktion bei zellulären Differenzierungs-, Wachstums- und Apoptoseprozessen einnimmt. Inaktivierung oder Veränderungen dieses Gens werden mit der Entstehung verschiedener Tumore aus unterschiedlichen Geweben in Zusammenhang gebracht. Da p53 eine Schlüsselposition bei der komplexen Steuerung von Proliferation und Apoptose hat, bedarf es der exakten Klärung der molekularen Zusammenhänge zwischen verändertem Tumorsuppressor und der Entwicklung von Tumorzellen. Zhu und Mitarbeiter (1994) beschreiben, dass das p53 Protein seine Konformation von der wachstumshemmenden „Suppressor-Form“ (wt = „wild type“) in die proliferationsfördernde Variante, die sogenannte „Promotor-Form“ (mut = „mutated“) wechseln kann. Diese Konformationsänderung bestätigen Ritchie und Mitarbeiter (1997) mit ihrer Beobachtung, dass wt p53 Protein in Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien hauptsächlich dann detektierbar ist, wenn die Zellen für eine gewisse Zeit in Wachstumsfaktor-freien Medium gehalten werden. Wt p53 nimmt bei diesen Zellen die wachstumsreprimierende „Suppressor“-Konformation ein, indem es transkriptionsaktivierend auf Gene wirkt und das Wachstum unterdrückt. Ein Beispiel dafür ist das Protein p21.

p21 inhibiert verschiedene cyclinabhängige Kinasen („cycline dependent kinase“, CDKs) (Xiong et al., 1993). CDKs beeinflussen durch Phosphorylierung den Aktivitätszustand von Rb, dem Retinoblastom-Protein. Hypophosphoryliertes Rb bindet und inhibiert auf diese Weise den Transkriptionsfaktor E2F. Bei Freisetzung dieses Faktors nach Hyperphosphorylierung von Rb wird die Expression von Genen angeregt, die zur DNA-Synthese benötigt werden. Durch Inhibition der CDKs wird der Zellzyklus arretiert, bevor die S-Phase eintritt. In diesem Moment wird die Expression von GADD45 („growth arrest DNA damage inducible gene“) durch p53 induziert. Der Zelle wird Zeit gegeben, die nötigen DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren. Sind DNA-Schädigungen irreparabel, wird die p53 vermittelte Apoptose induziert. Dabei wirkt p53 auf BAX-1 transkriptionsaktivierend. Bax-1 bindet das Apoptoseschutzprotein Bcl-2 und blockiert dessen Funktion (Prokocimer & Rotter, 1994; Poremba et al., 1996; Sinov & Haupt, 1998).

5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die Proliferation hämatopoietischer Zellen wird durch Cytokin-induzierte Signaltransduktionen in hohem Maße beeinflusst. Daran beteiligt sind der Ras/Raf/MAPK-, der PI-3K/p70S6K- und der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Ihle et al., 1994; Brennan et al., 1997; Kolonics et al., 2001). Trotz umfangreicher Kenntnisse über die drei Signaltransduktionswege hinsichtlich ihrer einzelnen Komponenten, ist der genaue Zusammenhang proliferationsfördernder sowie anti-apoptotischer Eigenschaften für myeloische Zellen noch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Klärung, ob Wachstumsfaktor-Abhängigkeit und wt p53 in AML-Zelllinien korrelieren, da p53 als Mediator für Cytokin-unabhängig reguliertes Wachstum beschrieben wurde. Desweiteren sollte überprüft werden, welcher der drei Signaltransduktionswege den stärksten Einfluß auf die Proliferation myeloischer Zellen hat und welcher für die Unterdrückung der Apoptose verantwortlich ist. Da sich während dieser Arbeit herausstellte, dass die p70S6K als zentraler Mediator proliferativer aber auch anti-apoptotischer Prozesse angesehen werden kann, sollten potentielle neue Liganden dieses Enzyms mit Hilfe des „*Yeast Two-Hybrid*“-Systems identifiziert werden.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Bayer (Leverkusen), Difco (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), MWG Biotech (Ebersberg), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Leiden, Holland), Pharmacia (Erlangen), Promega (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Die Enzyme stammten von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Bad Schwalbach), GIBCO BRL Life Technologies (Eggenstein) und Roche (Mannheim).

Bezugsquelle für radioaktive Chemikalien war die Firma Amersham (Braunschweig).

1.2 Bakterien

Für die Klonierungen wurden folgende Bakterienstämme eingesetzt, die von der DSMZ (Braunschweig) stammen:

1. DH5 α ' (Woodcock, D.M. et al. (1989))

deoR, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, Δ (*lacZYA-argFV169*), $\phi 80lacZ\Delta M15$, F'

2. XL 1 Blue (Bullock, W.O. et al.(1987))

endA1, *gyrA96*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *lac*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, F'[*proAB*, *lacI^q* $\Delta M15$, Tn10]

1.3 Hefen

Im Rahmen der Anwendung des MATCHMAKER „Yeast Two-hybrid“-Systems (Clontech, Heidelberg) wurde folgender *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm eingesetzt:

1. AH 109 (James et al., 1996)

MATa, *trp 1-901*, *leu 2-3, 112*, *ura 3-52*, *his 3-200*, *gal4*, *gal 80*, *LYS2:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *ura3:: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*, *lacZ*; Auxotrophiemarker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

Als Standardmedium für die Kultivierung von Hefezellen wurde YPD-Medium verwendet:

<u>YPD:</u>	Hefeextrakt	10,0 g
	Pepton	20,0 g
	dH ₂ O ad	950 ml
	autoklavieren und 50 ml 40%iger Glucose zufügen	

Für YPD-Agar-Platten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt.

Für die Expression von rekombinantem Protein und die Selektion transformierter Hefen wurde SD-Medium (synthetic medium) verwendet.

<u>SD:</u>	yeast nitrogen base without aminoacids (Difco)	6,7 g/l
	Aminosäurelösung	1 x

10 x Aminosäurelösung:	L-Isoleucin	300 mg
	L-Valin	1500 mg
	Adenin-Hemisulfatsalz	200 mg
	L-Arginin HCl	200 mg
	L-Histidin-Monohydrat	200 mg
	L-Leucin	1000 mg
	L-Lysin HCl	300 mg
	L-Methionin	200 mg
	Phenylalanin	500 mg
	L-Threonin	2000 mg
	L-Tryptophan	200 mg
	L-Tyrosin	300 mg
	Uracil	200 mg

Die abgewogenen Aminosäuren wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt, der pH Wert auf 5,8 eingestellt und autoklaviert. Je nach gewünschtem Selektionsmedium, wurden die entsprechenden Aminosäuren weggelassen.

Für den β -Galaktosidase Filterassay wurden folgende Puffer und Lösungen benötigt:

Z-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	16,1 g
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	5,5 g
	KCl	0,75 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,246 g
	ad d H ₂ O	1000 ml

X-Gal-Stammlösung: 20 mg X-Gal auf 1 ml N,N-Dimethylformamid

1.4 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten menschlichen Zelllinien sind in der Tabelle II. 3 (siehe II. 2.4.1) zusammengefaßt und stammen bis aus wenige Ausnahmen von der DSMZ (Braunschweig).

1.5 Vektoren

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte in den Vektoren pGEM-T und pGEM-T Easy von Promega (Heidelberg). Diese Vektoren besitzen 3'-überhängende Thymidin-Reste. Diese verhindern die Religation und ermöglichen eine effiziente Insertion von Fragmenten, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert worden sind. Diese Polymerase versieht die Enden der Fragmente mit 3'-überhängenden Adenosinresten. Die *multiple cloning site* (MCS) dieses Vektors liegt in dem β -Galactosidase-Gen, wodurch eine phänotypische Selektion Insert-tragender Klone durch die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht wird. Als Selektionsmarker dient das β -Lactamase-Gen, das eine Ampicillin-Resistenz vermittelt.

Als Expressionssysteme für Hefen zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im „Yeast Two-Hybrid“-System wurden die Vektoren pGBKT7 und pACT2 (Clontech) verwendet. Bei beiden Vektoren wird das klonierte Insert als Fusionsprotein exprimiert. Bei einer Interaktion der klonierten Proteine wird durch die Fusionsanteile der beiden Vektoren der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert. Der Vektor pACT2 kodiert für die aktivierende Domäne und pGBKT7 für die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors.

pGBKT7 : GAL4₍₁₋₁₄₇₎ DNA-Bindungsdomäne, *TRP1*, *ADHI*-Promoter, kan^r

pACT2: GAL4₍₇₆₈₋₈₈₁₎ DNA-Aktivierungsdomäne, *LEU2*, *ADHI*-Promoter, amp^r

Als Expressionssysteme für Zellkultur-Zellen wurden die Vektoren pcDNA3 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Giesemann, TU-Braunschweig), pDsRed1-N1 (Clontech) und pMC-EGFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt

von Dr. C. Mielke, Würzburg) verwendet. Der pcDNA3 Vektor kann neben der Verwendung in der *in vitro* Transkription und Translation auch für die Expression von rekombinantem Protein in Eukaryonten eingesetzt werden. Eine hohe Expressionsrate wird durch die starke Enhancer-Promoter-Region (P_{cmv}) des Cytomagalovirus erreicht.

Desweiteren wurden für Lokalisationsstudien in humanen Zellen die Vektoren pDsRed1-N1 und pMC-EGFP verwendet. Der Vektor pDsRed1-N1 exprimiert das rot fluoreszierende Protein, isoliert aus der Seeanemone *Discosoma* (Matz et al., 1999), zusammen mit dem klonierten Insert als Fusionsprotein. Bei dem Vektor pMC-EGFP wird das grün fluoreszierende Protein, das aus der Qualle *Aequoria victoria* stammt (Prasher et al., 1992; Chalfie, et al., 1994), mit dem klonierten Insert als Fusionsprotein exprimiert.

Zur Herstellung stabiler Klone wurden HEK-293 Zellen mit dem Puromycin-Resistenzplasmid pSV2pac und dem gewünschten Expressionsvektor cotransfiziert. Die Selektion erfolgte mit 0,7 µg/ml Puromycin im Medium (Vara et al., 1985).

pcDNA3:	T7 und SP6-Promoter, SV40-Promoter, amp^r , neo^r , dieser Vektor wurde durch die Einführung eines N-terminalen Flag-Tags modifiziert, (Flag-Peptid-Sequenz: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys).
pDsRed1-N1:	CMV IE-Promoter, kan^r , neo^r , Reportergen DsRed1
pMC-EGFP:	CMV IE-Promoter, amp^r , neo^r , Reportergen EGFP
pSV2pac:	Puromycin-Resistenzplasmid

1.6 Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen.

F-p53 Ex4	5' - GCC AAC TCT GTG ACT TGC ACG -3'
R-p53 Ex11	5' - TCA GTC TGA GTC AGG CCC TTC T -3'
SN2	5' - ACG TAC TCC CCT GCC CTC AA -3'
SC3	5' - GCG TGT GGA GTA TTT GGA TG -3'
ASC3	5' - TAT TCT CCA TCC AGT GGT TT -3'
ASN2	5' - GTC TTC CAG TGT GAT GAT GG -3'

F-p70S6 EcoRI 5'- GAA TTC ATG AGG CGA CGA AGG -3'

R-p70S6 SalI 5'- GTC GAC TCA TAG ATT CAT ACG- 3'

F-313 p70S6K 5'- GAA ACT AGT GTG AAC AGA GGG CCA- 3'

F-611 p70S6K 5'- TCA GTG GAG GAG AAC TAT TTA TGC- 3'

F-894 p70S6K 5'- CCA CAA TCG TGC TGT GGA TTG- 3'

F-1259 p70S6K 5'- TGT CGA CAG CCC AGA TGA CTC- 3'

F-TRAF4 EcoRI 5'- GAA TTC ATG CCT GGC TTC GAC TAC- 3'

R-TRAF4 XhoI 5'- CTC GAG TCA GCT GAG GAT CTT CCG- 3'

F-380 TRAF4 5'- TAC AGG GCC ACC TGA ATA CCT- 3'

F-680 TRAF4 5'- CTA AGG AGT TCG TCT TTG ACA CCA- 3'

F-980 TRAF4 5'- TGG AGG AGC TAT CAG TGG GC- 3'

F-1280 TRAF4 5'- CTA AAC CAC AGC ACG TCA CTG AG- 3'

F-TRAF4HindIII 5'- AAG CTT ATG CCT GGC TTC GAC TAC- 3'

R-TRAF4 ApaI 5'- TGG GCC CAA GCT GAG GAT CTT- 3'

pACT2-F 5'- CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C- 3'

pACT2-R 5'- GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG A- 3'

ACTIN-F 5'- ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG- 3'

ACTIN-R 5'- CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC- 3'

ABL-F 5'- TGA CTT TGA GCC TCA GGG TCT GAG TGA AGC C- 3'

ABL-R 5'- CAT TTT TGG TTT GGG CTT CAC ACC ATT CC- 3'

1.7 Antikörper

Die während dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in folgenden Tabellen aufgelistet.

Tab. II. 1 Primär-Antikörper

AK-Bez.	Antigen	Typ	IP/IF	Western	Firma
Anti-Phospho-p70S6 Kinase	Phospho-Thr 421/Ser424	Kaninchen IgG (Serum)	IF 1:250	1:1000	New England Biolabs
Anti-p70S6 Kinase	p70S6 Kinase	Kaninchen IgG (Serum)	IF 1:250	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-S6	S6 Ribosomal Protein	Kaninchen IgG (Serum)	-	1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-S6	Phospho-Ser 235/236	Kaninchen IgG (Serum)	-	1:1000	New England Biolabs
Anti-TRAF4	TRAF4	Ziege IgG (Serum)	IP 1:100	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Flag	Flag-Tag	Maus IgG (monoklonal)	-	1:1000	Sigma
Anti-Erk-1 (p42/p44)	Erk-1	Kaninchen IgG (Serum)	-	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Phospho-Erk1 (p42/p44)	Phospho-Erk1	Maus IgG (monoklonal)	-	1:200	Santa Cruz Biotechnology
p53 (Ab-3)	mut p53	Maus IgG (monoklonal)	IP 1:100	-	Merck
p53 (Ab-5)	wt p53	Maus IgG (monoklonal)	IP 1:100	-	Merck
p53 (Ab-7)	p53	Schaf IgG (Serum)	-	1:5000	Merck
Anti-phospho STAT5	Y694/Y699	Kaninchen IgG (Serum)	-	1:20	Biomol
Anti-Stat5 (MGF)	Stat5	Maus IgG (monoklonal)	-	1:2000	Biomol

IP: in Immunpräzipitationen eingesetzte Verdünnungen; IF: in Immunfluoreszenzen eingesetzte Verdünnungen; Western: im Immunblot eingesetzte Verdünnung.

Tab. II. 2 Mit Fluorochromen gekoppelte oder biotinylierte Sekundär-Antikörper

Antikörper	eingesetzte Verdünnung
anti-IgG -mouse TRITC/ FITC	IF: 1:120
anti-IgG -rabbit TRITC/ FITC	IF: 1:80/1:160
anti-mouse Ig (biotinylated species specific F(ab') ² fragment (from sheep))	Western: 1:500
anti-rabbit Ig (biotinylated species specific F(ab') ² anti-yeast vacuolar fragment (from donkey))	Western: 1:500
anti-sheep/goat Ig (biotinylated whole antibody (from donkey))	Western: 1:400
anti sheep IgG (biotinylated whole antibody (from rabbit))	Western: 1:25000
Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex	Western: 1:400

Diese Antikörper wurden von den Firmen Amersham LIFE SCIENCE und Calbiochem bezogen

1.8 Cytokine und Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden folgende Cytokine verwendet und von den Firmen R+D Systems (Wiesbaden) oder Roche (Mannheim) bezogen:

FLT3-L (fötale Leber Tyrosinkinase 3-Ligand), 25 kDa

Zielzelle: Stammzellen, Progenitorzellen

Produzentenzellen: Stromazellen im Knochenmark

Rezeptor: Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie

GM-CSF (Granulocyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor), 22 kDa

Zielzelle: GM-Vorläuferzellen

Produzentenzellen: T-Lymphocyten, Endothelzellen, Fibroblasten

Rezeptor: Cytokin-Familie

IL-1 (Interleukin-1), 17,5 kDa

Zielzelle: Granulocyten, Monocyten, B-Zellen, T-Zellen

Produzentenzellen: Granulocyten, Monocyten

Rezeptor: Cytokin-Familie

IL-3 (Interleukin-3), 14-30 kDa

Zielzelle: pluripotente Stammzellen, die meisten Vorläuferzellen, viele ausdifferenzierte Zellen

Produzentenzellen: T-Lymphocyten, Epidermiszellen

Rezeptor: Cytokin-Familie

M-CSF (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor), 70 kDa (Dimer)

Zielzelle: GM-Vorläuferzellen und Makrophagen

Produzentenzellen: Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten

Rezeptor: Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie

SCF (Stammzellen Faktor), 40-50 kDa (Dimer)

Zielzelle: blutbildende Stammzelle

Produzentenzellen: Stromazellen im Knochenmark und viele andere Zellen

Rezeptor: Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie

TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α), 17 kDa, als Trimer 45-50 kDa

Zielzelle: Hämatopoietische Vorläuferzellen, Dendritische Zellen, Monocyten, epi-und endotheliale Zellen, B-Lymphocyten

Produzentenzellen: Granulocyten, Monocyten,

Rezeptor: Cytokin-Familie

TPO (Thrombopoietin), 35 kDa

Zielzelle: Megakaryocyten

Produzentenzellen: Stammzellen, Blutplättchen und Megakaryocyten

Rezeptor: Cytokin-Familie

Zur Hemmung von Kinasen und damit spezifischer Signaltransduktionswege wurden folgende Inhibitoren eingesetzt:

Rapamycin (ICN Biomedicals, Meckenheim):

Inhibitor der Frap/mTor Kinase, verhindert die Phosphorylierung der p70S6K

Wortmannin (Sigma, Deisenhofen):

PI-3 Kinase Inhibitor, nachfolgende Signaltransduktionsmoleküle werden nicht mehr phosphoryliert, darunter auch die p70S6K.

PD98059 (Calbiochem, Bad Soden):

MAPK-Kinase-Inhibitor, die Phosphorylierung der MAP-Kinase wird gehemmt.

AG-490 (Biomol, Hamburg): JAK2 Tyrosin-Kinase Inhibitor.

1.9 Geräte

Autoklav	Zirbus HST 32/25
Bakterienschtüttler	New Brunswick Scientific G24 Environmental Incubator Shaker
Cytospin-Zentrifuge	Shandon Cytospin 3
Durchflußcytometer	Becton Dickinson FACScan
Elektroblotter	Biorad Semi-dry-transfer cell
Elektrophoresen	Gibco BRL Modelle Horizo 11 14; 58 Biorad Mini-Protean II
Hybridisierungsöfen	Bachofen 400 HY-EG
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC5-C; Rotor GSA, SS34 Heraeus Sepatech Omnifuge 2.0 RS
Mikroskope	Zeiss Invertmikroskop ID 03 Nikon Type 104 mit Nikon Kamera-Aufsatz FX 35-WA
Netzgeräte	Pharmacia GPS 200/400 LKB 2197
pH-Meter	Omnilab Calimatic 766
Spektrophotometer	LKB Ultraspec Plus
Sterilbank	Heraeus LaminAir HLB 2472 GS
Stickstofftanks	Taylor-Wharton, 35 HC
Scintillationszähler	LKB Rackbeta Liquid Scintillation Counter
Thermocycler	Perkin Elmer DNA Thermal Cycler PE Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700
Tischzentrifugen	Beckman Microfuge E, Eppendorf 5415 C Heraeus Sepatech Biofuge A
Ultrazentrifuge	Beckman L8-70M
Vakuum-Trocknungs- anlage	Zirbus Univapo 150 H mit Kühlfalle VaCo I und Ölschieberpumpe Telstar 2P-3
Videoprintsystem	Kodak EDAS 290
Waage	Sartorius Universal, Sartorius Analytic

Zell-Harvester LKB Wallac 1295-001 Cell Harvester

Zellkultur-Inkubator Forma Scientific, Modell 3194

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Präparation

2.1.1.1 Präparation hochmolekularer (HMW) DNA aus eukaryontischen Zellen

Bei hochmolekularer genomischer DNA muß die Aufarbeitung und die spätere Analyse sehr sorgfältig und unter Ausschluß von Scherkräften erfolgen, da es sonst zu Strangbrüchen kommen kann.

Zur DNA-Aufarbeitung wurden $5\text{--}40 \times 10^6$ Zellen mit PBS gewaschen und für 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, mit 5 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS) versetzt und geschwenkt. 15 µl RNase (10 mg/ml) wurden hinzupipettiert und für 3 h bei 37°C unter leichtem Schwenken im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und ü.N. bei 37°C weiter inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Phenol und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz in ein Corexröhrchen überführt und mit Parafilm verschlossen. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min bei 2000 rpm. Der klare Überstand wurde in ein neues Corexröhrchen überführt, ohne die Interphase mitzunehmen. 5 ml Chloroform wurden zugegeben, gut gemischt und wieder für 15 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand in einen Dialyseschlauch gefüllt und 1-2 Tage bei 4°C gegen dH₂O dialysiert.

2.1.1.2 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab aus *E.coli*

Eine 1,5 ml *E.coli*-Übernachtskultur wurde 5 min bei 6000 x g zentrifugiert und das Bakteriensediment in 150 µl TELT (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 62,5 mM EDTA, 0,4% (v/v) Triton X-100, 2,5 M LiCl) und 15 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert. Nach intensivem Vortexen erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min, Erhitzen auf 95°C für 2 min und Abkühlen auf Eis für 5 min. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g für 8 min wurden die sedimentierten Zellbestandteile mit einem sterilen Zahnstocher

entfernt und 100 µl Isopropanol zugegeben. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 13.000 x g. Die DNA wurde mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, in der Speed Vac für 3 min getrocknet und in 50 µl dH₂O inkl. 1 µl RNase A (1 mg/ml) resuspendiert.

2.1.1.3 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA mit dem *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen, Hilden) wird über Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Ein spezielles hydrophiles Trägermaterial gewährleistet durch sein Ausschlußvolumen von ca. 100 µm und eine hohe Oberflächendichte von DEAE-Gruppen eine Trennung der Plasmid-DNA von Proteinen, Polysacchariden, DNA-Oligomeren etc. Die Durchführung der Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des *Qiagen Plasmid Handbook*.

2.1.2 RNA-Präparation

Zur RNA-Aufarbeitung wurden 5-10 x 10⁶ Zellen mit PBS gewaschen und für 4 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml TRIzol-Reagent (Gibco) versetzt und durch mehrfaches Hochziehen mit der Pipette homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, kurz geschüttelt, um die Phasentrennung zu erleichtern und für 3 min bei RT stehengelassen. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C. Die obere wäßrige Phase, in der die RNA enthalten ist, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 100 µl dH₂O aufgenommen und für 10 min bei 56°C gelöst. 10 µl der RNA-Lösung wurden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die restlichen 90 µl der RNA-Lösung wurden als Ethanolpräzipitat mit 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,4) und 300 µl 100% Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

Photometrische Konzentrationsbestimmung: $OD \times 40 \times V = c \text{ RNA } [\mu\text{g/ml}]$

OD = optische Dichte
V = Volumen
c = Konzentration

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden gemäß ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA-Lösung wurde mit 1/5 Volumen Ladepuffer (10% Ficoll, 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol) gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Dazu wurden 1 %-ige Agarosegele in 1 x TAE (2,0 M Tris/HCl, pH 7,8; 1,0 M Natriumacetat, 0,1 M EDTA) eingesetzt, die für DNA-Fragmente in einem Bereich von ca. 0.4 kb bis 7 kb geeignet sind. Die DNA-Fragmente wurden mittels des interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromids, das dem Gel direkt zu einer Endkonzentration von 250 ng/ml zugesetzt wurde, unter UV-Licht detektiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V.

2.1.4 DNA-Fragmentisolierung mit *Jetsorb*

Die Methode beruht darauf, dass DNA in einer flüssigen Lösung an feingemahlenes Glas („Glasmilch“) bindet und auf diese Weise aus einem verflüssigten Agarosegel isoliert werden kann. Dazu wurde der *Genomed Jetsorb-Kit* (Genomed, Bad Oeynhausen) benutzt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel geschnitten und entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Für DNA-Fragmente zwischen 500 bp und 5000 bp ist diese Methode sehr gut geeignet.

2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und die Ermittlung des Verunreinigungsgrades durch Proteine oder Phenol wurde photometrisch durchgeführt. Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA und RNA 40 µg/ml. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäurereste und Phenol) bestimmt. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen; durch Verunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.1.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Sequenzen. TypII Endonukleasen erkennen spezifische, palindromische DNA-Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden und schneiden in Gegenwart von $MgCl_2$ die DNA innerhalb dieser Sequenz. Dabei entstehen in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder einzelsträngige, überstehende, sogenannte „sticky ends“ oder doppelsträngige „blunt ends“. Die Reaktionsbedingungen der jeweiligen Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingehalten. Für die DNA-Hydrolyse wurden zwischen 1-3 μg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-50 μl mit 0,1-1 U Enzym pro μg DNA eingesetzt.

2.1.7 Dephosphorylierung von endständigen 5'-Phosphatresten

Um die Rezirkularisierung eines nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysierten Vektors zu unterbinden, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch eine Phosphatase-Behandlung entfernt. Da die verwendete T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) aktivierte 5'-Enden zum katalytischen Angriff auf die 3'-OH-Gruppen benötigt, wird somit eine Rezirkularisierung verhindert. Verwendet wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP: shrimps alkaline phosphatase, Pharmacia) und der mitgelieferte Reaktionspuffer nach Herstellerangaben.

2.1.8 Auffüllreaktion 5'-überstehender Enden (Klenow-Reaktion)

Bei einem Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen entstehen DNA-Fragmente mit nicht komplementären, überstehenden Enden, die vor der Dephosphorylierung und folgender Ligation mit einer Auffüllreaktion der zurückgesetzten Enden mit dem Klenow-Fragment (Yousaf et al., 1984) der DNA-Polymerase I behandelt werden müssen. Dieses Enzym beinhaltet eine 3'→5'-Exonuklease- und eine 5'→3'-Polymerase-Aktivität, aber im Gegensatz zur DNA-Polymerase I keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch können die komplementären Basen des 5'-überstehenden DNA-Stranges mit freien Nukleotidtriphosphaten (dNTP's, 10 mM) aufgefüllt werden.

In einem Ansatz von 20 µl (bis zu 1 µg DNA/10 µl) sind bis zu 2 pmol 5'-überstehende Enden vorhanden. Zur DNA wurden die dNTP's in einer Endkonzentration von 25 µM (5 µl einer Mischung aus je 100 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zugegeben, außerdem 5 µl 10 x Klenow-Puffer (500 mM Tris/HCL, pH 7,2; 100 mM MgSO₄, 1 mM DTT) und 1-2 U des Klenow-Enzyms (MBI Fermentas). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert um das Enzym zu inaktivieren und die DNA per *Jetsorb* (s. II. 2.1.4) isoliert.

2.1.9 T4 DNA-Polymerase-Reaktion zur Herstellung von „blunt ends“

Entstehen nach einem Restriktionsverdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen 3'- und 5'-überstehende Enden, müssen diese modifiziert werden, um eine Ligation zu ermöglichen. Die T4 DNA-Polymerase ist dafür gut geeignet, da sich dieses Enzym ähnlich verhält wie das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, d.h. die 5'→3' Exonuklease-Aktivität fehlt, die 5'→3' Polymerase-Aktivität ist vorhanden. Die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität der T4 DNA-Polymerase ist um etwa den Faktor 250 größer als beim Klenow-Fragment, was aber durch Zugabe von dNTP's im Überschuß ausgeglichen werden kann. Dadurch ist es möglich in nur einem Ansatz das 3'-überstehende Ende bis zum Beginn des Doppelstranges abzubauen und das 5'-überstehende Ende mit freien Nukleotidtriphosphaten aufzufüllen.

Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt 2 µg verdaute DNA, alle 4 dNTP's in einer Endkonzentration von 100 µM, 10 µl 5 x Puffer (335 mM Tris/HCl, pH 8,8; 33 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 84 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mg/ml BSA) und 10 U der T4 DNA-Polymerase (MBI Fermentas). Diese Mischung wurde für 20 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung der T4 DNA-Polymerase wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 65°C inkubiert.

2.1.10 Phenol-Extraktion

Proteine und andere Verunreinigungen werden aus wäßrigen Nukleinsäure-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Zu der DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und durch 2 minütiges Vortexen gut vermischt. Proteine werden durch die Extraktion mit Phenol vollständig denaturiert

und reichern sich nach Abtrennung der wässrigen Phase von der organischen Phase, durch 5 minütige Zentrifugation bei 13000 x g, in der Interphase an. Um weitere Verunreinigungen in der wässrigen Phase auszuschließen, wurde die Phenol-Extraktion noch einmal wiederholt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert (s. II. 2.1.11).

2.1.11 Ethanol-Präzipitation

Die Ethanolpräzipitation ist ein Reinigungsverfahren und wird außerdem zur Anreicherung von DNA eingesetzt. Dazu wurden DNA-Lösungen mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,4) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt, durchmischt und gefällt. Dann wurde die DNA durch 15 minütige Zentrifugation bei 13000 x g sedimentiert und das Präzipitat in 70% Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde abgezogen, das DNA-Pellet in der Speed-Vac für 3 min getrocknet und anschließend in dH₂O oder in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) gelöst.

2.1.12 *In vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen zwei DNA-Fragmenten katalysiert. Als Cofaktoren werden bei eukaryotischen DNA-Ligasen ATP, bei prokaryotischen NAD zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt.

Die Ligation wurde in 10 µl-Ansätzen durchgeführt (1,0 µl 10 x Ligase-Puffer, 1,5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas), Insert und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von ca. 5:1) und über Nacht bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde mit Butanol gefällt, um die bei der Transformation störenden Salze zu entfernen. Dazu wurde der Ligationsansatz (10 µl) mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt und 250 µl Butanol dazugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Nach dem Trocknen wurde das fast durchsichtige Pellet in 10 µl dH₂O gelöst und konnte für die Transformation von Bakterien eingesetzt werden.

2.1.13 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Für die Transformation von *E. coli* wurden 50 µl der kompetenten Zellen (s. Abschnitt II. 2.2.2) auf Eis aufgetaut und mit 10-500 ng DNA versetzt (entspricht 5-10 µl des Ligationsansatzes). Diese Suspension wurde in vorgekühlte Transformationsküvetten (*E. coli* Pulser Cuvettes; 0,1 cm Elektrodenabstand) pipettiert, in den Gene Pulser eingespannt und mit 1,8 V; 25 µF; 200 Ω transformiert. Die so behandelte Bakteriensuspension wurde sofort mit 300 µl LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Der gesamte Transformationsansatz wurde zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Fragmente angewandt. Das Prinzip beruht darauf, dass man die Nukleinsäuren, die die gewünschte Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei Primern hybridisiert, die aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz stammen und strangspezifisch sind. Dadurch entstehen kurze Doppelstrangbereiche, die für die Taq-Polymerase als Startpunkte dienen. Diese besonders hitzestabile DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*) hat ein Temperatur-Optimum von über 70°C und ist auch bei 95°C für kurze Zeit stabil.

Reaktionsansatz:

dNTP-MIX (5mM)	1,0 µl
Primer I (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer II (10 pmol/µl)	1,0 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
DNA-Template	1,0 µl
Taq-Polymerase (100 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Der 10 x PCR-Puffer setzt sich wie folgt zusammen: 100 mM Tris/HCl, pH 8,8; 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40. Taq-Polymerase und 10 x PCR-Puffer wurden von Qiagen bezogen.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- Vorzyklus: Heizphase auf 94°C
 für 7 min auf 94°C bleiben (Denaturierung)
 auf 72°C abkühlen und für 3 min halten (Zugabe der Taq-Polymerase)
 für 2 min auf Annealingtemperatur gehen (z.B. Primer-Annealing
 55°C)
 für 10 min bei 72°C bleiben (Polymerisation)
- Hauptzyklus: (25, 30, 35 Zyklen)
 für 30 sec auf 94°C aufheizen
 auf Annealingtemperatur abkühlen und für 30 sec halten
 für 1 min auf 72°C gehen
- Nachzyklus: Abkühlen auf 72°C
 für 15 min 72°C

Die Annealingtemperatur kann für die eingesetzten Primer in etwa nach der „nearest-neighbour interaction“ berechnet werden, indem man von 2°C für ein A/T und 3°C für ein G/C-Paar ausgeht (Breslauer et al., 1986; Rychlik et al., 1990). Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgt mit der jeweils niedrigsten Schmelztemperatur der Oligonukleotide. Der Ansatz wurde mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet und kurz anzentrifugiert. Wurde die PCR-Reaktion im Gene Amp PCR System 9700 durchgeführt, konnte aufgrund der Deckelheizung, die einen Verdunstungsschutz bietet, auf die Überschichtung mit Mineralöl verzichtet werden. Die Polymerase wurde erst nach der 1. Denaturierung dazugegeben, um unspezifisches „Annealing“ zu vermeiden. Anschließend wurden die PCR-Produkte im 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.1.14.1 Klonanalyse mittels PCR

Mit der Mini-PCR läßt sich das Vorhandensein eines Inserts in einem Plasmid relativ schnell nachweisen.

<u>Reaktionsansatz:</u>	10 x PCR-Puffer	1,0 µl
	Primer I (10 pmol/µl)	1,0 µl
	Primer II (10 pmol/µl)	1,0 µl
	dNTP-Mix (5 mM)	1,0 µl
	Taq-Polymerase (100 U/µl)	1,0 µl
	dH ₂ O	5,0 µl

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Kolonie „gepickt“, in den oben genannten Reaktionsansatz überführt und der Insertbereich mittels PCR amplifiziert.

2.1.15 cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase stellt eine Kopie der DNA (cDNA) von einem mRNA-Molekül her, so dass eine DNA/RNA-Hybridhelix entsteht. Behandelt man diese mit RNaseH aus *E.coli*, wird nur der RNA-Strang in seine Nukleotide gespalten. Zurück bleibt ein cDNA Einzelstrang, der anschließend von der DNA-Polymerase zum DNA-Doppelstrang ergänzt wird. Sowohl die Reverse Transkriptase als auch die DNA-Polymerase benötigen einen Primer, um mit der Synthese beginnen zu können. Für die Reverse Transkriptase kann man zu diesem Zweck entweder kurze Oligonukleotide von 6 Basen, die zufällig an die mRNA hybridisieren, sogenannte „Random-Hexamers“ benutzen, oder Oligo(dT).

Es wurden 1-5 µg der gesamt RNA aus Zellen eingesetzt. Zuerst erfolgte eine Fällung der in dH₂O gelösten RNA für 30 min bei -80°C. Durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 x g und 4°C wurde die RNA sedimentiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das in der Speed-Vac getrocknete Pellet wurde in 11,5 µl RNase freiem dH₂O aufgenommen. 1,5 µl der 30 mM „Random Hexamers“ wurden dazupipettiert und für 10 min bei 70°C zur Resuspension der RNA inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Dann folgte die Zugabe von 4 µl 5 x First strand buffer (250 mM Tris/HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ und 0,1 M DTT), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix, das Ganze wurde gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Zu dieser Mischung wurde 1 µl (200 U) *SuperScriptTM II* (Reverse Transkriptase (Gibco BRL)) gegeben, vorsichtig durch auf- und abpipettieren gemischt und für 50 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde der Ansatz 15 min bei 70°C gehalten. Um die zur cDNA komplementäre RNA zu entfernen, wurde 1 µl (2 U) RNaseH aus *E.coli* den Ansätzen zugefügt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die so erhaltene cDNA konnte in weiteren

PCR-Reaktionen als „first template“ zur Synthese gewünschter Gene mit spezifischen Primern eingesetzt werden.

Als Kontrolle wurde eine Aktin-PCR (s. II. 2.1.14) mit einem 5'-und 3'-Aktin-Primer durchgeführt. Die Annealing Temperatur beträgt bei den verwendeten Aktin-Primern 55°C.

2.1.16 „Single Strand Conformational Polymorphism“ (SSCP)

Diese Methode ist sehr gut geeignet, um Nukleotidsequenz-Polymorphismen auch in Form von Punktmutationen zu detektieren. Dazu werden kurze Genabschnitte (100-300 bp) mittels PCR amplifiziert und durch Verwendung von [α - 32 P] dCTP radioaktiv markiert. Die denaturierten und damit einzelsträngigen PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamidgel unter nichtdenaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Das Mitführen einer Wildtyp (wt) Kontrolle ist unbedingt notwendig, um ein verändertes Bandenmuster in der Autoradiografie detektieren zu können. Die Vorteile dieser Methode liegen neben der Aufdeckung von Punktmutationen in der Untersuchung großer Probenzahlen. Außerdem müssen DNA-Bereiche, die keine Veränderungen in der SSCP-Analyse zeigen, nicht unnötig sequenziert werden. Die Genauigkeit liegt bei über 95% (Orita et al., 1989).

In einer ersten PCR-Reaktion wurde eine Region von 800 bp des p53 Gens (Exon 4-11) aus der cDNA (s. II. 2.1.15) aller untersuchten Zelllinien amplifiziert. Dazu wurden 1 μ l cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 μ l verwendet. Zu diesem Ansatz wurden je 10 pmol der Primer F-p53Ex4 und R-p53Ex11 (s. II. 1.6), 1,25 U der Taq-Polymerase (Qiagen), 250 μ M dNTP's (Eurogentech, Seraing, Belgien) und 1/10 Volumen des 10 x PCR Puffers (Qiagen) gemischt. Die PCR-Reaktion wurde wie in Abschnitt II. 2.1.14 beschrieben, mit einer Annealing-Temperatur von 63 °C, durchgeführt. Diese Amplifikate wurden 1:10000 verdünnt und 1 μ l davon als Grundlage weiterer PCR-Reaktionen zur Amplifikation kurzer (\approx 400 bp) DNA-Fragmente eingesetzt. Hier wurden je 10 pmol der Primer-Paare SN2/ASN2 und SC3/ASC3 (s. II. 1.6) verwendet (Zakut-Houri et al., 1985). Außerdem wurden dem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l folgende Substanzen zugesetzt: 1, 25 μ l Taq-Polymerase, 1 μ Ci [α - 32 P] dCTP (spez. Aktivität > 3000 Ci/mmol) (Amersham), 125 mM dNTP's und 1/10 Volumen des 10 x PCR Puffers. Die PCR-Reaktion erfolgte wie in Abschnitt II. 2.1.14 beschrieben.

Für die SSCP-Analyse wurde 1 µl des zweiten PCR-Produktes 1:25 mit SSCP-Puffer (10 mM EDTA, 0,1% SDS) verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit dem SSCP-Ladepuffer (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) vermischt. Die Proben wurden zur Trennung des DNA-Doppelstranges für 15 min gekocht und sofort für 10 min auf Eis inkubiert. 5 µl davon wurden auf ein 6%-iges nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0; 10% Glycerol) geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 12-15 h bei 7 Watt und RT. Nach dem Trocknen des Gels unter Vakuum wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -80°C zwischen 2 h und mehreren Tag, je nach Stärke des Signals, exponiert. Von den Zelllinien, die ein abnormales Laufverhalten in der SSCP-Analyse zeigten, wurde die entsprechende p53 cDNA (Exon 4-11) in den pGEM-T Vektor (s. II. 1.5) kloniert und anschließend sequenziert (s. II. 2.1.17).

2.1.17 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger und Mitarbeitern (1977). Hierbei werden zusätzlich zu den Desoxynukleotiden 2', 3'-Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppen keine weiteren Phosphodiesterbindungen ausbilden können und somit zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen. Durch den Einsatz von unterschiedlich markierten 2', 3'-Didesoxynukleotiden können die so erzeugten unterschiedlich langen DNA-Fragmente farblich unterschieden werden und nach Auftrennung in einem hochauflösenden Polymer automatisch sequenziert werden. Hierzu wurde der ABI Prism 310 Genetic Analyzer von Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) eingesetzt.

Für eine Sequenzreaktion wurden 0,5 µg DNA (aus Quiagen-Präparation), 3 µl Premix (Perkin Elmer) und 1,6 pmol Primer mit dH₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die anschließende PCR-Reaktion fand in dem Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) bei entsprechender Annealingtemperatur statt. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 10 µl dH₂O, 2 µl 3 M NaAc pH 5,4 und 55 µl 100 % EtOH p.a. zugesetzt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 x g wurde der Überstand abgenommen, die DNA 2 x mit 70 %-igem EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 15 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) gelöst. Nach Denaturierung bei 90°C für 2 min konnte die Probe zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.1.18 „Yeast Two-Hybrid“-System

Das „Yeast Two-Hybrid“-System ermöglicht eine *in vivo* Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hefezellen und ist insbesondere für den Nachweis transienter und schwacher Wechselwirkungen geeignet. Dieser Assay basiert auf der räumlichen Trennung von DNA-bindender und transkriptionsaktivierender Domäne vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Die DNA-bindende Domäne ermöglicht die Bindung des Transkriptionsfaktors an stromaufwärts des entsprechenden Transkriptionsstartpunktes gelegene regulatorische DNA-Sequenzen, während die transkriptionsaktivierende Domäne für die Initiation der Transkription erforderlich ist. Da die funktionellen Eigenschaften auch bei einer solchen physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben, lassen sich Interaktionen von Proteinen über die Rekonstitution des intakten Transkriptionsfaktors nachweisen (Fields and Sternglanz, 1994).

Um einen neuen Interaktionspartner der p70S6 Kinase im „Yeast Two-Hybrid“-System zu identifizieren, wurde die Hela-cDNA-Bank pACT2 („MATCHMAKER *Two-Hybrid system*“, Clontech) gescreent. Dazu wurde die cDNA-Sequenz der p70S6 Kinase in den Hefe-Expressionsvektor pGBKT-7 (siehe II. 1.5) kloniert und zusammen mit der amplifizierten cDNA Bank in den Hefestamm AH-109 (siehe II. 1.3) transformiert. Zur Selektion wurden die Hefen auf Leucin/Tryptophan/Histidin-SD-Mangelplatten ausplattiert und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert. Die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine einzelner Kolonien wurde durch einen β -Galaktosidase-Filterassay gezeigt (siehe II. 2.1.18.3). Anhand der erhaltenen Sequenzen konnte ein computergestützter Datenbankvergleich (Blast) erfolgen.

2.1.18.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

50 ml eines Hefestammes wurden über Nacht in YPD-Medium bei 30°C unter Schütteln angezogen. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte (OD_{600}) gemessen und 300 ml YPD so angeimpft, dass die Start-OD bei 0,2 lag. Die Hefen wurden für weitere 3 h bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 1100 rpm für 5 min bei RT. Das Sediment wurde in 50 ml dH_2O resuspendiert und die Zellen nochmal bei 2000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml 1 x

TE/LiAc (1 ml 10 x TE, 1 ml 10 x LiAc, 8 ml dH₂O; 10 x TE: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 10 x LiAc: 1 M Lithiumacetat, pH 7,5) resuspendiert. Nach dieser Prozedur können die Hefezellen sofort transformiert werden oder 1-2 h bei RT aufbewahrt werden.

2.1.18.2 Transformation von Hefen

Für die Transformation wurden 0,05-0,2 µg Plasmid-DNA, 100 µg Carrier-DNA (10 mg Heringssperma-DNA von Sigma, wurde in 1 ml dH₂O gelöst und durch Erhitzen bei 100°C für 20 min in Einzelstrang-DNA aufgeschmolzen), 100 µl der kompetenten Hefezellen und 600 µl PEG/LiAc-Lösung (8 ml 50% PEG 3350, 1 ml 10 x TE, 1 ml 10 x LiAc) in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert. Dieser Ansatz wurde durch Vortexen gut gemischt. Danach folgte eine Inkubation von 30 min bei 30°C unter Schütteln, dann wurden 70 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben und vorsichtig gemischt, es folgte ein Hitzschock von 15 min im 42°C Wasserbad. Die Zellen wurden 2 min auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation für 5 sec bei 13000 rpm geerntet und in 50 µl TE resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen wurde der Transformationsansatz auf Leucin/Tryptophan/Histidin-SD-Mangelplatten verteilt und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert. Nur solche Klone, die erfolgreich mit beiden Plasmiden transformiert worden waren, konnten ihren Auxotrophiemangel kompensieren und auf den SD-Selektionsplatten wachsen.

2.1.18.3 β -Galaktosidase-Filterassay

Treten Interaktionen zwischen zwei Proteinen auf, kommt es zur räumlichen Annäherung und somit zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4, der daraufhin eine Transkription und Expression des Reportergens β -Galaktosidase ermöglicht. Die Aktivität des gebildeten Enzyms β -Galaktosidase wird in einem Filter-Assay nachgewiesen, bei dem sich die Kolonien, die das Enzym exprimieren, durch den Umsatz des Substrates X-Gal blau färben.

Die auf Platten gewachsenen Hefekolonien wurden auf ein Filterpapier (Ø 150 mm, Roth, Karlsruhe) übertragen und ihre Zellwände durch kurzzeitiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die so behandelten Filter wurden auf Z-Puffer/X-Gal (100 ml Z-Puffer, 0,27 ml β -Mercaptoethanol, 1,67 ml X-Gal-Stammlösung, siehe

II. 1.3) getränkte Filterpapiere gleicher Größe gelegt und für bis zu 8 h bei 30°C inkubiert. Kommt es innerhalb dieser Zeit zur Blaufärbung der Klone, bedeutet dies eine Interaktion zwischen zwei Proteinen im „*Yeast Two-Hybrid*“-System. Eine spätere Blaufärbung wurde als nicht positiv bewertet.

2.1.18.4 Plasmidisolierung aus Hefe

Die Plasmidisolierung aus transformierter Hefe basiert auf der Methode von Hoffmann & Winston (1987). Die Hefe-Plasmid DNA ist wegen der hohen Verunreinigung durch genomische DNA nicht für Sequenzierungen oder Restriktionsanalysen geeignet. Man kann aber einen Zwischenschritt wählen und zunächst *E.coli* mit den Hefe-Plasmiden transformieren. Die aus den Bakterien isolierten Plasmide sind dann rein genug, um sie für die oben genannten Analysen zu verwenden.

Die im β -Galaktosidase-Filter-Assay als positiv gewerteten Kolonien wurden von den Originalplatten, die zwischenzeitlich weiter bei 30°C inkubiert wurden, steril entnommen und in 0,5 ml SD-Medium resuspendiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C unter Schütteln bei 220 rpm. Anschließend wurden die Hefezellen für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand entnommen und in der restlichen Flüssigkeit (ca. 50 μ l) erneut resuspendiert. Diese Ansätze wurden mit 10 μ l Lyticase (5 U/ μ l in TE, Sigma) versetzt und durch auf und ab pipettieren gemischt. Es folgte eine Inkubation für 30-60 min unter Schütteln (220 rpm) bei 37°C. Nach dieser Zeit wurden 10 μ l 20% SDS zugegeben und durch Vortexen für 1 min gemischt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren und zügig wieder aufgetaut. Das Volumen der Hefesuspension wurde mit TE-Puffer auf 200 μ l eingestellt, um das gleiche Volumen eines Phenol/Chloroform/Isopropanol Gemisches (25:24:1) zuzufügen. Nach 5 minütigem Vortexen, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 8 μ l 10 M Ammonium-Acetat und 500 μ l Ethanol versetzt. Nach 1 stündiger Inkubation bei -80 °C wurden die Ansätze für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 20 μ l dH₂O gelöst. Mit den so gewonnenen Hefe-Plasmiden konnten Bakterien transformiert werden.

2.1.19 Radioaktive Markierung von DNA

2.1.19.1 „Random-primed Oligolabeling“

Das „Random-primed Oligolabeling“ ist eine Methode zur radioaktiven Markierung von DNA mit hoher spezifischer Aktivität. Sie beruht auf der Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide mit einer Länge von 9 Basen. Statistisch gesehen tritt in einem DNA-Molekül etwa alle 100 Basenpaare eine komplementäre Sequenz auf, an der die Oligonukleotide hybridisieren können. Diese Oligonukleotide dienen in folgenden Reaktionen als Startstellen für die Neusynthese der DNA durch DNA-Polymerasen, die Nukleotidtriphosphate und speziell α -[^{32}P]-dCTP einbauen.

Zur radioaktiven DNA Markierung wurde das *PRIME-IT RmT Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) verwendet. Es wurden 25-50 ng DNA in ein „single-use reaction tube“ pipettiert und mit dH₂O auf ein Volumen von 42 μl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 min zur Trennung des DNA-Doppelstranges gekocht, das Kondensat durch kurze Zentrifugation wieder gesammelt. Für die folgende radioaktive Markierung wurden 5 μl α -[^{32}P]-dCTP (3.000 Ci/mmol) und 3 μl Magenta DNA-Polymerase (4 U/ μl) zugegeben, gemischt und 5-10 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden 2 μl Stop-Mix (0,5 M EDTA, pH 8,0) zugefügt und freie Nukleotide über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt.

2.1.19.2 Abtrennung freier Nukleotide

Zur Abtrennung freier Nukleotide, die bei der Hybridisierung störend wirken, wurden Sephadex G-50 Säulen verwendet. Dazu wurde etwas Glaswolle in eine Pasteur-Pipette gestopft und mit dH₂O angefeuchtet. Das in TE-Puffer gequollene Sephadex G-50 wurde luftblasenfrei bis zur oberen Verjüngung der Pipette überschichtet und mit etwas dH₂O gespült. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit der markierten DNA auf die Säule gegeben und solange mit dH₂O eluiert, bis im Eluat Radioaktivität meßbar war. Anschließend wurden 3-5 Fraktionen a 200 μl in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und je 1 μl davon einer TCA-Fällung (s. II. 2.1.19.3) unterzogen.

2.1.19.3 Bestimmung der radioaktiven Einbaurate durch Trichloressigsäure- (TCA) Fällung

Für die TCA-Fällung wurden je 1 µl der einzelnen Eluat-Fraktionen mit 99 µl Torula-Hefe-tRNA (10 mg/ml) gemischt und 10 µl davon auf Fiberglas-Filter (Whatman GF/A) getropft und luftgetrocknet. Der Rest wurde mit 2 ml einer eiskalten 10%-igen Trichloressigsäure-Lösung versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde das Präzipitat auf einen frischen Fiberglas-Filter gesaugt, mit 5%-iger TCA-Lösung und mit 10 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrockneten Filter wurden in Scintillationsröhrchen gegeben und mit Scintillationsflüssigkeit überschichtet. Im Scintillationszähler erfolgte die Messung der „Counts“ pro min. Die Einbaurate der Nukleotide in die DNA läßt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\% \text{ eingebaute Nukleotide} = \frac{\text{cpm eingebaut}}{\text{cpm gesamt}} \times 100$$

cpm eingebaut:	„Counts“ des Präzipitates pro min
cpm gesamt:	„Counts“ im Gesamtansatz pro min

Radioaktiver Einbau pro Fraktion:

$$\Sigma \text{ cpm eingebaut} = \text{cpm eingebaut} \times \frac{10}{9} \times \text{Vol.}$$

Vol.: Volumen der Eluat-Fraktion

Die Fraktionen mit mehr als 60% Einbau wurden vereinigt, 10 min bei 95°C gekocht, auf Eis abgekühlt und anschließend zur Hybridisierung verwendet. Für eine Membran mit 20 RNA Proben sind 6×10^6 cpm, die in die DNA eingebaut wurden, ausreichend.

2.1.20 Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen

2.1.20.1 Southern-Blot

Für die anschließende Hybridisierung zur Identifikation komplementärer DNA können DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel als Einzelstränge

auf Membranen transferiert werden (Southern, 1975). Vor dem Transfer sollten lange DNA-Fragmente (> 2 kb) mit $0,25$ M HCl depurinieren werden, damit sie während des alkalischen Transfers in Teilfragmente zerfallen, um leichter aus dem Gel gelöst und auf die Membran überführt werden zu können. Die alkalischen Transfer-Bedingungen bewirken eine Denaturierung der DNA.

Dazu wurde das Gel direkt nach der Elektrophorese für 15 min in $0,25$ M HCl geschwenkt, kurz mit $0,4$ M NaOH neutralisiert und anschließend in die Blotkammer überführt. Das DNA-Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf Whatman-Papier gelegt, das auf einem Basisblock oberhalb des Transferpuffers ($0,4$ M NaOH) lag und dessen Ränder in die Flüssigkeit eintauchten. Direkt auf das Gel wurde eine der Gelgröße entsprechende, mit dH_2O angefeuchtete, „GeneScreen“-Nylonmembran luftblasenfrei aufgebracht. Darauf wurde eine weitere Lage Whatman-Papier und ein Stapel saugfähiger Papiertücher gelegt. Der Stapel wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Aufgrund der Kapillarkräfte werden die Nukleinsäuremoleküle aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die Transferzeit sollte mind. 12 h betragen. Anschließend wurde die Membran mit 1 M Tris/HCl + $1,5$ M NaCl (pH $7,6$) gewaschen und luftgetrocknet. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde sie für 30 min bei 120°C „gebacken“. In Plastikfolie eingeschweißt wurden die Membranen bei 4°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

2.1.20.2 Northern-Blot

Diese Methode ist vom Verfahren her dem „Southern“-Transfer ähnlich, unterscheidet sich nur darin, dass anstelle von DNA beim „Northern“-Transfer RNA auf die Nylonmembran übertragen und dort immobilisiert wird.

Direkt nach der denaturierenden Elektrophorese wurde das RNA-Gel und die passende „GeneScreen“-Nylonmembran für 15 min in $20 \times \text{SSC}$ (175 g NaCl, 88 g Na-Citrat, pH $7,0$; 2% SDS, dH_2O ad 1 l) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel (s. Abschnitt II. 2.1.20.1) in die Blotapparatur gelegt, die mit $20 \times \text{SSC}$ als Transfer-Puffer gefüllt war. Der Transfer sollte mind. 24 h, besser 36 h dauern. Die Membran wurde in $3 \times \text{SSC}$ gewaschen, um Gelreste zu entfernen, und auf einem Filterpapier getrocknet. Für die kovalente RNA-Bindung wurde die Membran 1 h lang bei 80°C inkubiert. In

Plastikfolie eingeschweißt wurden die Membranen bei 4°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

2.1.20.3 Kolonie-Filter-Hybridisierung

Um die Repräsentativität der amplifizierten cDNA-Bank die im „*Yeast Two-Hybrid*“-System verwendet wurde, zu prüfen, wurde eine Kolonie-Filter-Hybridisierung für β -Aktin durchgeführt. Zunächst wurde dazu der Titer der cDNA-Bank ermittelt, indem 10 μ l der cDNA-Bank in mehreren Schritten verdünnt, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert wurden. Die Platten mit einer Verdünnung von 10^9 (Bakterienrasen) und 10^{12} (ca. 200 Kolonien) wurden mit einer „GeneScreen“-Nylonmembran bedeckt, vorsichtig gerieben und die Kolonien abgezogen. Diese „Replika“-Membranen wurden für die Hybridisierung vorbereitet. Die Lösungen I (0,5 M NaOH), II (1,0 M Tris/HCl, pH 7,5) und III (0,5 M Tris/HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl) wurden für die Isolierung und Fixierung der DNA auf die Nylonfilter benötigt.

Die „Replika“-Membranen wurden mit der Kolonieseite nach oben nacheinander auf Frapanfolien gelegt, auf die zuvor je 750 μ l der einzelnen Lösungen pipettiert wurden und für 5 min bei RT inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtupfen der Filterunterseite auf Whatman-Papier entfernt. Die Filter wurden je 2 x in Lösung I und II und 1 x in Lösung III inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Filter zwischen 2 Lagen Whatman-Papier gelegt und vorsichtig gerieben, um Bakterienreste und Proteine abzulösen. Anschließend wurde die DNA für 1 h bei 60°C kovalent an die Membran gebunden. Die Prähybridisierung erfolgte für mind. 4 h bei 42°C in einem Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation. Die Prähybridisierungslösung (5 ml 10 x Pipes-Puffer, pH 6,5 (4,0 M NaCl, 0,1 M Pipes (Piperazine-N,N'-bis [2-ethansulfonsäure])), 25 ml deionisiertes Formamid, 2,5 ml 10% SDS, 1,0 ml (10 mg/ml) Fisch-Sperma-DNA, ad dH₂O auf 50 ml) wurde auf 50°C vorgewärmt, mit frisch denaturierter Fisch-Sperma-DNA (10 min, 95°C) versetzt und zu den Filtern gegeben.

Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung durch angewärmte Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung + 1×10^7 cpm markierte β -Aktin-Sonde/Filter) ersetzt und bei 42°C ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die Membranen

zweimal mit 3 x SSC und einmal mit 0,5 x SSC für je 30 min bei 65°C gewaschen, in Plastikfolie eingeschweißt und in einer Autoradiographie-Kassette mit Verstärkerschirm und Röntgenfilm bei -80°C ü.N. exponiert.

2.1.20.4 Filterhybridisierung

Die nach „Southern“-oder „Northern“-Transfer immobilisierten Nukleinsäuren wurden mit spezifischen Sonden aus radioaktiv markierter DNA hybridisiert. Die Hybridisierung nach einem „Southern“-Transfer erfolgte analog zur Kolonie-Filter-Hybridisierung (s. II. 2.1.20.3). Nach einem „Northern“-Transfer wurde die Membran mit 3 x SSC angefeuchtet und mit 5 ml einer Prähybridisierungslösung (10 x Denhardt's, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 3 x SSC, 50 mg/l Herings-Sperma-DNA) in einer Glasröhre unter Rotation für mind. 4 h bei 62°C hybridisiert.

100 x Denhardt's-Lösung:	Ficoll	2%
	Polyvinylpyrrolidon	2%
	Rinderserumalbumin (BSA)	2%
	in dH ₂ O bei 40°C lösen	

Nach erfolgter Prähybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde dazugegeben und für mind. 16 h bei 62°C rotierend hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 3 x SSC und zweimal mit 1 x SSC für je 20 min bei 62°C gewaschen. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, in eine Autoradiographie-Kassette überführt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit richtete sich nach der Intensität des radioaktiven Signals, von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen.

2.1.21 Gel-Shift

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein DNA-Fragment im elektrischen Feld, je nach seiner Größe, unterschiedlich weit wandert. Ein Protein-DNA-Komplex wandert eine kürzere Strecke während der Elektrophorese als ungebundene DNA. Die vor der Elektrophorese mit Digoxigenin markierte DNA läßt sich später mit einem spezifischen Antikörper detektieren. Kernextrakte (siehe II. 2.5.6) wurden hergestellt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (EMSA; electrophoretic gel mobility

shift assay). Die DNA-bindende Sequenz [5'- TCG ACA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GC -3'] von NF- κ B wurde als digoxigenin (dig)-markierte DNA-Sonde verwendet. Pro Ansatz wurden die gleichen Mengen Kernprotein (5-10 μ g) mit 40 fmol dig-markierter Sonde inkubiert. Nach 15 min Inkubation bei 25 °C in einem Volumen von 20 μ l (20 mM Hepes, pH 7.6; 1 mM EDTA, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM DTT, 0,2% Tween 20, 30 mM KCL, 50 μ g/ml poly [d(I-C)], 5 μ g/ml poly L-Lysin) war die DNA-Bindungsreaktion abgeschlossen. Die Proben wurden auf 6%-igen nativen Acrylamid, 0,25 x TRIS Borat-EDTA Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylon-Membranen (Roche) geblottet. Die Detektion der dig-markierten Sonde erfolgte mit dem alkalische Phosphatase gekoppelten anti-dig mAntikörper (Roche) unter Verwendung eines ECL-Detektionssystems (siehe II. 2.3.2).

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden in autoklaviertem LB-Vollmedium kultiviert.

Zusammensetzung von LB-Medium:

Bacto-Trypton (Difco)	10,0 g
Bacto-Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	10,0 g
dH ₂ O ad	1,0 l
lösen und den pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen	

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium mit 1/1000 Volumen einer Ampicillin-Stammlösung (150 mg/ml) supplementiert, wobei das hitzeinstabile Ampicillin dem Medium erst bei einer Temperatur von etwa 50°C zugegeben wurde. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 13 g/l Agar-Agar zugegeben.

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien können Plasmid-DNA aufnehmen, wenn sie vorher durch eine bestimmte Behandlung „kompetent“ gemacht werden. Dazu wurden 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika-Zusatz mit den zu transformierenden Bakterien angeimpft und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die üN-Kultur wurde in 500 ml LB-Medium überführt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}} = 0,5-0,8$) bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) weiter inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf Eis gestellt und bei 4°C bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem sterilem dH₂O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert, zentrifugiert, in 1,5 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin aufgenommen und als 50 µl Aliquots in auf -80°C vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe in einem Polyacrylamid-Gel. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein starkes, negativ geladenes Detergens, das an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet und sie denaturiert. Seine stark negative Ladung bewirkt, dass alle Proteine negativ geladen vorliegen und ihre Eigenladung zu vernachlässigen ist. Das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld wird dadurch nicht beeinflusst.

Die Proteinproben wurden mit Auftragspuffer (s. unten) versetzt und vor dem Auftragen für 10 min bei 95°C aufgeköcht um höhere Strukturen aufzubrechen. Die Gelelektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 80 V (Sammelgel) und 140 V (Trenngel) in SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (s. unten) durchgeführt. Die Gele wurden entweder zur Detektion der aufgetrennten Proteine gefärbt, Färbelösung (s. unten) oder mittels Semi-dry-blotting auf eine Nitrocellulose- oder PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membran transferiert.

Folgendes Glycin-Gelsystem wurde verwendet:

	5 %	8 %	10 %	12 %	15 %	Sammel-gel
H₂O bidest	8,75 ml	7,25 ml	6,25 ml	5,25 ml	3,75 ml	3,05 ml
Trenngellösung*	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
Sammelgellösung*	-	-	-	-	-	1,25 ml
Acrylamidlösung*	2,50 ml	4,00 ml	5,00 ml	6,00 ml	7,50 ml	0,65 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl
Trennbereich	90 - 300 kD	40 - 200 kD	30 - 130 kD	20 - 100 kD	16 - 60 kD	

Die Angaben sind für 2 Glycin-Minigele im Format 5 x 8 x 0.1 cm (H x B x T)

* = SDS-PAGE Trenngellösung: 1,5 M Tris/Cl , pH 8,8; 0,4% SDS
 SDS-PAGE Sammelgellösung: 0,5 M Tris/Cl, pH 6,8; 0,4% SDS
 SDS-PAGE Acrylamidlösung: 30% Acrylamid (w/v); 0,8% Bisacrylamid (w/v)

2 x SDS-PAGE-Auftragspuffer:

375 mM Tris/HCl, pH 6,8
 2% SDS (w/v)
 12% Glycerin (w/v)
 Bromphenolblau (Spatelspitze)

SDS-Elektrophoresepuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8,7
 0,1% SDS (w/v)
 400 mM Glycin

Färbelösung:

200 ml Essigsäure
 250 ml Isopropanol
 0,5 g Coomassie blue
 auf 2 l mit dH₂O

Entfärbelösung:

200 ml Essigsäure
 250 ml Isopropanol
 auf 2 l mit dH₂O

Molekulargewicht des verwendeten Markers:

Molecular-Weight-Standard-Mixture (Biorad):

	<u>High Range</u>	<u>Low Range</u>
Myosin	200,000 kDa	
β-Galaktosidase	116,250 kDa	
Phosphorylase-B	97,400 kDa	97,400 kDa
Rinderalbumin	66,200 kDa	66,200 kDa
Ovalbumin	45,000 kDa	45,000 kDa
Carboanhydrase	31,000 kDa	31,000 kDa
Trypsin Inhibitor		21,500 kDa
Lysozym		14,400 kDa
Aprotinin		6,500 kDa

2.3.2 Immunoblot

Mit der Westernblot-Methode (Immunoblot) können Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Proteinlösungen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. II. 2.3.1) aufgetrennt. Anschließend wurden das Gel, die Nitrocellulose-Membran und sechs Whatman-Papiere für ca. 10 min im Blotpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,5; 150 mM Glycin, 10% Methanol) äquilibriert. Drei Lagen Whatman-Papier wurden auf die Anodenplatte der Semi-dry-Blotkammer gelegt, darauf eine Nitrocellulose-Membran und das Gel, das mit weiteren drei Lagen Whatman überschichtet wurde. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und die Spannung angelegt. Geblottet wurde mit einer Stromstärke von 2-3 mA/cm² Gel (ca. 150 mA/Minigel) für 30 min.

Mittels reversibler Ponceaurot-Färbung wurde der Transfer überprüft und die Markerbanden zur dauerhaften Markierung gekennzeichnet. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit dH₂O. Anschließend wurde die Membran in 5% Milchpulver in PBS oder in 5% BSA in PBS zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der spezie-spezifische biotinylierte Sekundär-Antikörper zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion spezifischer Banden erfolgte mit dem Biotin/Streptavidin-HRP-System (Amersham) in Kombination mit dem „Renaissance Western Blot Chemoluminescence Reagent“-Protokoll (DuPont, Bad

Homburg). 1 ml der ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung I wurde mit 1 ml der ECL-Lösung II gemischt und die Membran darin für 2 min unter Schwenken inkubiert. Überschüssige ECL-Lösung wurde abgestreift, der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf einem ECL-Film (Kodak) exponiert.

2.3.3 Coimmunpräzipitation

TF-1 (1×10^7), Hela und HEK-293 Zellen (1×10^6) wurden in Kulturflaschen gehalten. Hela und TF-1 Zellen wurden untransfiziert verwendet, HEK-293 Zellen wurden transfiziert (s. II. 2.5.5) und 16 h später 3 x mit PBS + 2 mM MgCl_2 gewaschen, um anschließend für 20-30 min bei RT unter Schütteln mit dem 1:100 in Medium verdünnten membranpermeablen Crosslinker dithio-bis(succinimidylpropionat) (DSP, Pierce, Sankt Augustin) inkubiert zu werden (100 x DSP: 20 mg/ml in DMSO). Überschüssiger Crosslinker wurde danach mit 0,2 mM Glycin in PBS + 2 mM MgCl_2 abgesättigt. Die Zellen wurden mit 1 ml RIPA-Puffer plus frisch dazugegebenen Proteaseinhibitoren (50 mM Tris, pH 7,2; 1% (v/v) Triton X-100; 0,25% Na-Desoxycholat; 1 mM EGTA; 150 mM Natriumazid; 1 mM Na-orthovanadat; 0,2 mM PMSF; 0,46 μM Aprotinin; 1,0 μM Leupeptin) für 30 min bei 4°C unter Schwenken lysiert.

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellscrapers (Nunc, Wiesbaden) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst, durch mehrmaliges aufziehen mit einer Kanüle homogenisiert und bei 1500 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 25 μl eines 1:1 Gemisches aus Protein G-Sepharose (Sigma, Deisenhofen) und RIPA-Puffer + 2% BSA versetzt. Es folgte eine Inkubation unter Schwenken bei 4°C für 1 h. Die Sepharose wurde wieder abzentrifugiert (s. o.), der Überstand mit 2 μg des entsprechenden Antikörpers versehen und nach Zugabe frischer Proteaseinhibitoren (s. o.) über Nacht bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Um die Immunkomplexe zu präzipitieren wurden 40 μl 50% Protein G-Sepharose + 2% BSA zugegeben und weitere 1-2 h unter Rotieren bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinkomplexen sedimentiert und 3 x mit eiskaltem RIPA + Proteaseinhibitoren und 1 x mit PBS gewaschen, bevor die trockene Sepharose in SDS-Probenpuffer + 10% (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen und für 10 min gekocht wurde, was zur Spaltung der Komplexe führte.

Die Detektion der Präzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblot (s. II. 2.3.1 und II. 2.3.2).

2.3.4 Immunpräzipitation unter nativen Zell-Lyse Bedingungen

Die native Zell-Lyse bietet den Vorteil, die zu präzipitierenden Proteine während des Aufarbeitungsprozesses nicht zu denaturieren, da manche Antikörper nicht in der Lage sind, Epitope, die durch denaturierende Bedingungen verändert worden sind, zu detektieren. Die Immunpräzipitation erfolgte analog der Coimmunpräzipitation (s. II. 2.3.3), nur dass die Zellen vor der Lyse nicht mit dem Crosslinker DSP behandelt wurden. Außerdem ist die Zusammensetzung des Lyse-Puffers unterschiedlich. Der hier verwendete Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 0,02% Natriumazid, 1 mM Natriumorthovanadat, 0,2 mM PMSF, 0,46 µM Aprotinin, 1,0 µM Leupeptin, 10 mM NaF).

2.3.5 *in vitro* Transkription und Translation von Proteinen

Über die *in-vitro* Transkription und Translation kann ein einzelnes Protein radioaktiv markiert werden. Hierbei ist keine Aufreinigung des Proteins nötig, die entsprechende kodierende Sequenz muß nur in einem geeigneten Vektor vorliegen. Durch die Gegenwart von [³⁵S]-Methionin bei der Translation wird die radioaktive Markierung des Proteins erreicht und somit ist eine hohe Sensitivität bei anschließenden Versuchen gewährleistet.

Die *in-vitro* Transkription und Translation von p70S6K und TRAF4 wurde mit dem „*TNT Coupled Reticulocyte Lysate System*“ von Promega durchgeführt. Dieses System hat den Vorteil, dass Transkription und Translation gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Als Expressionsvektor mit T7 Promoter wurde das Plasmid pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet.

<i>In vitro</i> -Translationsansatz:	Reticulocytenlysat	25 µl
	Reaktionspuffer	2,0 µl
	T7-Polymerase	1,0 µl
	Aminosäure-Mix ohne Methionin (1mM)	1,0 µl
	RNAsin (40 U/µl, Promega)	1,0 µl
	Plasmid-DNA (T7-Promoter)	1,0 µg
	[³⁵ S]-Methionin (10 mCi/ml)	1,0 µl
	dH ₂ O	ad 50 µl

Das Gemisch wurde für 30 min bei 90°C inkubiert. Zur Überprüfung der *in vitro*-Translation wurden 5-10% des Ansatzes per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die translatierten Proteine autoradiographisch nachgewiesen.

2.3.6 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Diese Methode eignet sich am besten für Proteinkonzentrationen im Bereich von 10 bis 100 µg/ml. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 reagiert dabei spezifisch mit Proteinen und bildet Komplexe aus, die ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm aufweisen. Der ungebundene Farbstoff zeigt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 465$ nm. Der Absorptionsanstieg bei $\lambda = 595$ nm wird photometrisch ermittelt. Zur Herstellung einer Kalibrier-Funktion wurden je 20 µl des Kalibrier-Standards (1 mg/ml Rinderserum-Albumin) in einer Verdünnungsreihe von 10-100 µg/ml pipettiert. Von den zu messenden Proben wurden ebenfalls je 20 µl in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 100 µl des Bradford-Reagenzes vermischt. Nach 2 min wurden die Proben photometrisch bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde durch den Vergleich der Extinktion mit der Kalibrier-Funktion ermittelt.

Herstellung des Bradford-Reagenzes: 70 mg Coomassie Brilliantblau wurden in 50 ml 100% Ethanol gelöst, 100 ml 85% (w/v) o-Phosphorsäure zugegeben und auf 1 l mit dH₂O aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und ist im Dunkeln bei RT für ca. 3 Monate haltbar.

2.4 Zellkulturtechnik

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit für die verschiedenen Versuche und Transfektionsexperimente verwendeten Zelllinien sind in Tabelle II. 3 aufgelistet.

Tab. II. 3: Verwendete Zelllinien und ihre Kulturbedingungen

Zelllinie	Kulturbedingungen; Medium	Zelltyp	Spezies	DSMZ
Cytokin-unabhängig wachsende hämatopoietische Zelllinien				
GDM-1	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M4	Mensch	ACC 87
HU-3	Standard; RPMI 1640 +20% FBS	AML M7	Mensch	-
HL-60	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M2	Mensch	ACC 3
KASUMI-1	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M2	Mensch	ACC 220
KG-1	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML	Mensch	ACC 14
MEG-01	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	CML	Mensch	ACC 364
ML-2	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M4	Mensch	ACC 15
MONO-MAC6	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M5	Mensch	ACC 124
MV4-11	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M5	Mensch	ACC 102
NB-4	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M3	Mensch	ACC 207
THP-1	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	AML M5	Mensch	ACC 16
Cytokin-abhängig wachsende hämatopoietische Zelllinien				
F-36P	Standard; RPMI 1640 +20% FBS + 5 ng/ml GM-CSF	AML M6	Mensch	-
M-07e	Standard; RPMI 1640 +10% FBS + 10% 5637	AML M7	Mensch	ACC 104
M-MOK	Standard; RPMI 1640 +10% FBS + 10% 5637	AML M7	Mensch	-
MUTZ-3	Standard; α MEM +10% FBS + 10% 5637	AML M4	Mensch	ACC 295
OCI-AML-1	Standard; α MEM +10% FBS + 10% 5637	AML M4	Mensch	-

OCI-AML-5	Standard; α MEM +10% FBS + 10% 5637	AML M4	Mensch	ACC 247
SKNO-1	Standard; RPMI 1640 +20% FBS + 2 ng/ml PIXY-321*	AML M2	Mensch	-
TF-1	Standard; RPMI 1640 +10% FBS + 10% 5637	AML M6	Mensch	ACC 334
nicht hämatopoietische Zelllinien				
293	Standard; 10% CO ₂ DMEM+10% FBS	Embryonale Niere	Mensch	ACC 305
Hela	Standard; RPMI 1640 +10% FBS	Cervix-Karzinom epithelial	Mensch	ACC 57

*PIXY-321: Fusionsprotein aus GM-CSF und IL-3.

2.4.2 Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen aus der Zellkultursammlung der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (1 ml) oder mit 6 Vertiefungen (5 ml). Außerdem wurden 24 cm² (bis 10 ml) und 83 cm² (bis 120 ml) Schräghalsflaschen, deren Deckel zum Gasaustausch leicht geöffnet wurden, verwendet (Nunc, Wiesbaden-Biebrich). Je nach Zelllinie wurden die Zellen in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 oder in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) supplementiert mit 5-20% hitzeinaktiviertem FBS (PAA, Linz, Austria), (45 min, 56°C; zur Inaktivierung der Komplementfaktoren) bei 37°C und 5% bzw. 10% CO₂-Konzentration in der Luft bei 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator gehalten (Abweichungen sind der Tabelle II. 3 zu entnehmen). Die Zellkulturen wurden im allgemeinen ohne Antibiotika zur Prophylaxe gegen bakterielle Infektionen gehalten. Penicillin und Streptomycin (100 x Pen/Strep: 0,606 g Penicillin (1 x 10⁶ U); 1,0 g Streptomycin) wurde nur in speziellen Fällen verwendet.

2.4.3 Passagieren

Der Mediumwechsel erfolgte je nach Zelldichte und Stoffwechselaktivität nach 2-4 Tagen, spätestens aber beim Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot, der in den Basismedien bereits enthalten ist und im pH-Bereich von 8,2 bis 6,4 von rot-violett

(basisch) über orange-rot (neutral) auf gelb (sauer) umschlägt. Bei Suspensionszellen wird die Zelldichte konstant gehalten, indem ein Teil der Zellsuspension abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wird. Zur Expansion der Zellkultur zentrifugiert man die Zellen bei 1000 rpm für 4 min oder läßt sie sedimentieren und nimmt vorsichtig den verbrauchten Medienüberstand ab. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versehen und in ein größeres Gefäß zur weiteren Kultivierung überführt.

Bei konfluent wachsenden Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die auf dem Kulturgefäßboden adhärierenden Zellen durch kurzzeitige Einwirkung von Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA, Seromed, Berlin) abgelöst (1 ml TE bei einer 24 cm² Schräghalsflasche). Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Durch vorsichtiges Schlagen der Schale an einer Kante wurden die Zellen vollständig von der Oberfläche abgelöst. Durch Zugabe von 2 ml Medium wurde die Enzymwirkung abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde schließlich in frischem Medium aufgenommen, die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit definierter Zellzahl in ein neues Kulturgefäß ausgesät.

<u>PBS:</u>	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	mit dH ₂ O auf 1l auffüllen, pH-Wert auf 7,2 einstellen; autoklavieren	

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl und Lebensfähigkeit

Zur Bestimmung der Viabilität von Zellen wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet; er bindet als Anion leicht an Proteine, kann aber nur bei toten Zellen die Zellmembran frei passieren. Lebende Zellen werden somit nicht gefärbt, tote Zellen erscheinen blau. Zur Durchführung dieses Tests wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1+1 mit Trypanblau gemischt und für 2 min inkubiert. Zur gleichzeitigen Bestimmung der Zelldichte wurde etwas von der Zellsuspension in eine Zählkammer (Neubauer Improved) gegeben und der prozentuale Anteil lebender Zellen bestimmt. Unter

Berücksichtigung der Verdünnung und des Volumens der Zählkammer wurde die Zelldichte als Anzahl lebender Zellen pro Milliliter ermittelt.

Berechnung der Zellzahl, Viabilität und Totalzellzahl:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10^4$$

$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{lebende} + \text{tote Zellen}} \times 100$$

$$\text{Totalzellzahl} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{vorhandenes Volumen}$$

2.4.5 Cryokonservierung von Zellen

Zelllinien können über einen langen Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Damit die Zellen bei dem Einfriervorgang keinen Schaden nehmen, wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet, das neben dem „normalen“ Kulturmedium ein Frostschutzmittel (10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) enthält. Die in Suspension gebrachten Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in frisch angesetzttem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellzahl sollte $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/ml betragen. Die Cryoröhrchen (Nunc; 1,5 ml) wurden in Nalgene-Einfrierboxen, die für eine konstante Temperaturerniedrigung von 1°C pro Minute mit Isopropanol gefüllt sind, bis auf -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.6 Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang sollte schnell erfolgen, da das im Einfriermedium enthaltene Zellgift DMSO bei manchen Zelllinien schon in geringen Konzentrationen zu Schädigungen der Zellen führen kann. Die Einfrierampullen wurden in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und

zweimal mit frischem Kulturmedium gewaschen. Nach Gesamtzellzahl- und Viabilitätsbestimmung wurden die Zellen in sterile Zellkulturflaschen ausgesät.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellzyklus-Analyse mit Propidiumiodid

Mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Durchflußcytometers (FACScan, Becton Dickinson) kann der DNA-Gehalt einer Zellsuspension ermittelt und damit die Phase des Zellzyklusses, in der sich einzelne Zellen befinden, gezeigt werden. Das FACScan wird hier zur Messung einzelner Zellen eingesetzt. Das Prinzip beruht darauf, dass die Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid behandelt werden, der fluoresziert wenn er an DNA bindet. Die Intensität der Fluoreszenz ist dann der DNA-Menge jeder einzelnen Zelle direkt proportional und spiegelt die Phase des Zellzyklusses wider. Zellen in der G₁-Phase haben unreplizierte DNA, in der G₂- oder M-Phase haben vollständig replizierte DNA und solche, deren DNA-Gehalt zwischen diesen beiden Werten liegt, befinden sich in der S-Phase.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit 2 ml -20°C kaltem 70%-igem Ethanol für 20 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1800 rpm zentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 90 µl PBS resuspendiert. Es wurden 10 µl RNase (10 mg/ml) hinzugegeben und die Zellen für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 2 ml PBS aufgefüllt und wieder zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 400 µl PBS aufgenommen und mit 40 µl Propidiumiodid (20 µg/ml) versetzt. Nach 10 min erfolgte die Messung am FACScan.

2.5.2 [³H]-Thymidin-Assay

Diese Methode ist dazu geeignet, die Proliferationsrate von Zellen zu untersuchen, z.B. wenn mit spezifischen Inhibitoren gearbeitet wird, die in proliferativ wirkende Signaltransduktionswege eingreifen. Man bietet den Zellen radioaktiv markiertes Thymidin an, das sie während der S-Phase als Baustein für die Neusynthese der

DNA verwenden. Die Einbaurate der so markierten Zellen wird am Scintillationszähler gemessen. Die Intensität der Radioaktivität ist ein Maß für das Erreichen der S-Phase. Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen und in einem Volumen von 50 µl pro Loch und einer Zelldichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen auf einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die Hemmstoffe wurden in den entsprechenden Konzentrationen in weiteren 50 µl zu den Zellen pipettiert. Nach 18 h wurden die Cytokine in einem Volumen von 100 µl dazugegeben und vorsichtig gemischt. 24 h später wurden 1 µCi [^3H]-Thymidin in einem Volumen von 10 µl in jedes einzelne Loch gegeben und für weitere 4 h im Inkubator gehalten. Die Zeiten variierten bei Kinetiken und dienen nur als allgemeingültiges Maß für einen [^3H]-Thymidin-Assay.

Die Zellernte erfolgte mit dem Cell Harvester 1295-001 (LKB), dabei wurden die Zellen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf einen Fiberglas-Filter gesaugt. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die einzelnen Filterstücke in Scintillationsröhrchen überführt und mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit bedeckt. Die Auswertung erfolgte im Scintillationscounter.

2.5.3 Annexin V Apoptose-Assay

Annexin V ist ein Protein, das spezifisch mit den Phosphatidylserinen der Phospholipiddoppelschicht interagiert. Bei apoptotischen Zellen wird diese Doppelschicht instabil, wobei die bei intakten Zellen innenliegenden Phosphatidylserine nach außen gekehrt werden. Annexin V bindet daher ausschließlich an apoptotische Zellen, was man sich zu Nutze macht, um den Prozentsatz apoptotischer Zellen in einer Zellsuspension zu ermitteln. Annexin V ist bei diesem Verfahren mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert und kann nach Bindung an die Zellen im Durchflußcytometer gemessen werden. Gleichzeitig können die Zellen mit Propidiumiodid behandelt werden, das bei poröser Kernmembran an die DNA bindet. Auf diese Weise wird zwischen früh und spät apoptotischen Zellen differenziert.

$1-4 \times 10^5$ Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, einmal mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl *Annexin V Incubation Reagent* (10 µl 10 x Binding-Buffer, 10 µl Propidiumiodid, 1 µl Annexin V-FITC, 79 µl dH₂O, R+D Systems) resuspendiert und für 15 min bei RT im

Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 1 x Binding-Buffer zu der Zellsuspension pipettiert und mit Hilfe des Durchflußcytometers analysiert. Die Analyse sollte innerhalb 1 h nach Zugabe des FITC-markierten Annexin V erfolgen, da innerhalb dieser Zeit die Signalstärke maximal ist.

2.5.4 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion liegt die eingeschleuste DNA extrachromosomal in den Wirtszellen vor, wird nur vorübergehend exprimiert und geht mit weiteren Zellteilungen wieder verloren. Die Transfektion isolierter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation oder dem *SuperFectTM Transfection Reagent* (Qiagen) durchgeführt. 24 h vor der Transfektion wurden HEK-293 Zellen mit einer Zelldichte von $1\text{-}3 \times 10^5$ Zellen/24 cm²-Kulturflasche ausgesät. 4 h vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit dem für die jeweilige Zelllinie entsprechendem Medium.

Herstellung des DNA-Calciumphosphat-Präzipitats:

Pro Ansatz wurden 6 µg (\cong 20 µl einer 300 µg/ml DNA -Lösung) der zu transfizierenden DNA eingesetzt und mit 430 µl sterilem dH₂O gemischt. Dazu wurden 50 µl 20 x CaCl₂ (2,5 mol/l) tropfenweise gegeben. Der Ansatz wurde für ca. 5 sec auf Stufe 6 auf dem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurde diese Mischung tropfenweise, unter ständigem Vortexen, zu 500 µl 2 x HEBS-Puffer gegeben, wobei die DNA zusammen mit dem Calciumphosphat präzipitierte und einen weißlichen Niederschlag bildete.

2 x HEBS-Puffer:

Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-Ethansulfonsäure)	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄ (pH 7,1)	1,5 mM
sterilfiltrieren (0,22 µm-Filter), aliquotieren und bei -20°C lagern	

Zur vollständigen Präzipitation wurden die Ansätze für 30 min bei RT erschütterungsfrei inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Durch den pH-Sprung kam es zu einer Verfärbung des Mediums im Bereich des Tropfens. Nach 15 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen 3-4 x

mit PBS gewaschen, um überschüssiges, von den Zellen nicht aufgenommenes Präzipitat zu entfernen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für die Coimmunpräzipitationen (s. II. 2.3.3) geerntet oder für Immunfluoreszenzen fixiert (s. II. 2.5.8).

2.5.5 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird das Plasmid in das Genom integriert, bei folgenden Zellteilungen mit verdoppelt und auf die Tochterzellen weitergegeben.

1×10^5 Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und 48 h inkubiert, 3 h vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die stabil transfizierten HEK-293 Zellen wurden mit Hilfe des *SuperFectTM Transfection Reagent* (Qiagen) transfiziert. Dazu wurden 6 µg der zu transfizierenden DNA zusammen mit 0,6 µg Selektionsplasmid (pSV2pac) eingesetzt. 130 µl DMEM ohne FCS und 25 µl *SuperFectTM Transfection Reagent* wurden zugefügt und sofort für 10 sec auf dem Vortexer gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Liposomenbildung wurden die 175 µl auf 1 ml mit DMEM+10% FCS aufgefüllt und auf die gewaschenen, mediumfreien Zellen gegeben. Nach 2 h wurden weitere 10 ml Medium auf die Zellen gegeben und ü.N. inkubiert. 48 h später wurde mit der Selektion stabil transfizierter Zellen begonnen, indem das Medium mit der Selektionsdroge Puromycin (0,7 µg/ml) versetzt wurde. Alle 2-3 Tage erfolgte ein erneuter Mediumwechsel unter Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes. Nach 10-14 Tagen wurden schließlich die ersten Zellklone sichtbar, die nach Erreichen der Stecknadelkopfgröße ausgezählt und mit Hilfe von Klonierungszyklindern passagiert wurden. Mit den so erhaltenen Einzelklonen konnten weitere Versuche durchgeführt werden.

2.5.6 Herstellung von Zell- und Kernextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden $2-4 \times 10^6$ Zellen in PBS gewaschen und in 25-50 µl frisch angesetztem Proteaseinhibitorpuffer (0,1 M NaCl; 10 mM Tris/HCL pH 7,5; 1 mM EDTA, 1 µg/ml Aprotinin; 100 µg/ml PMSF) resuspendiert. Sofort wurden die Zellen unter Zugabe gleichen Volumens 2 x SDS Probenpuffer (s. II. 2.3.1) lysiert,

für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden entweder sofort in der SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C gelagert.

Für Gel-Shift-Assays wurden Kernextrakte aus 5×10^5 - 1×10^7 Zellen benötigt, um speziell DNA-bindende Proteine zu isolieren. Die Extraktionsmethode beruht darauf, die Zellen in hypotonischem Medium zu lysieren, um anschließend die Kerne durch hohe Salzkonzentrationen zu extrahieren (Andrews & Faller, 1991).

Die Zellen wurden für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert und in 1,5 ml kaltem PBS aufgenommen und erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl eiskaltem Puffer A (10 mM Hepes-KOH, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension 3-4 x durch die Kanüle gezogen, für ca. 10 sec auf dem Vortexer gemischt und kurz bei 13000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Puffer A. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl eiskaltem Puffer C (20 mM Hepes; 25% Glycerol; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF) resuspendiert, für 20 min auf Eis inkubiert und für 2 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.5.7 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die Lokalisation einzelner Proteine wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Hierzu werden die Zellen zunächst fixiert und mit Hilfe von Ethanol oder Detergenzien permeabilisiert, so dass Antikörper auch an intrazelluläre Antigene binden können.

2.5.7.1 Paraformaldehyd-Fixierung und Triton-Permeabilisierung

Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen für mindestens 24 h oder durch Cytospin auf Objektträger aufgebrachte Suspensionszellen wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Fixierung erfolgte durch Inkubation mit 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT. Anschließend wurde die Fixierlösung durch Waschen entfernt und die Zellen wurden mit 0,2 % (v/v) Triton X-

100 in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert, nach weiteren Waschschritten konnte die Antikörper-Inkubation erfolgen.

2.5.7.2 Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol

Die Zellen wurden kultiviert und gewaschen wie oben beschrieben. Dann wurden die Zellen mit Methanol überschichtet und für 5 min auf Tiefkühlakkus (-20°C) inkubiert. Nach Absaugen des Methanols und drei Waschschritten mit PBS konnte die Antikörper Inkubation erfolgen.

2.5.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode kann die Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen lichtmikroskopisch dargestellt werden. Wichtig dafür ist die hohe Spezifität des ersten Antikörpers. Ein Verstärkungseffekt der Fluoreszenzintensität wird durch die Verwendung eines fluorochromierten speziesspezifischen Sekundär-Antikörpers erreicht.

Vor der Antikörper-Inkubation wurden die auf Deckgläschen bzw. Objektträgern fixierten Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Um die Glasfläche benetzbar zu machen, wurde diese 2-3 min mit 1% BSA bedeckt. Nach Absaugen der Lösung wurden 20 µl des entsprechenden Primär-Antikörpers aufgetropft und in einer feuchten Kammer für 30-60 min bei 30°C inkubiert. Die oben erwähnten Waschschrritte und das Benetzen durch BSA wurden wiederholt und es erfolgte die Inkubation (wie bereits beschrieben) mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper. Bei Doppelimmunfluoreszenzen wiederholten sich die beiden Inkubationen mit den weiteren Antikörpern. Anschließend wurden die Zellen 3 x in PBS gewaschen, kurz in dH₂O getaucht, in einem Tropfen Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA), einem speziellen Eindeckmittel, auf Objektträgern eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

III ERGEBNISSE

Der nachfolgende Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Teil soll Aufschluß darüber geben, ob p53 mit Cytokin-unabhängiger Proliferation in Zusammenhang steht und gleichzeitig die Detektion von neuen p53 Mutationen in AML-Zelllinien zeigen. Der zweite Abschnitt beschreibt den Einfluß Cytokin-induzierter Signaltransduktionen auf die Proliferation und anti-apoptotische Vorgänge in myeloischen Zellen. Zunächst wird die Spezifität der eingesetzten Inhibitoren geprüft, die die Signaltransduktionskaskaden an bestimmten Stellen unterbrechen. Darauf folgt die Optimierung der Stimulationszeiten mit dem in diesen Studien hauptsächlich verwendeten Cytokin IL-3. Anschließend wird der Einfluß der Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege bezüglich proliferativer sowie anti-apoptotischer Prozesse untersucht. Der Abschnitt endet mit der Klärung, ob es generelle Unterschiede bei den verschiedenen Rezeptorklassen gibt. Der dritte Abschnitt beschreibt das Screening und die Identifikation eines neuen Liganden der p70S6K mit Hilfe des „*Yeast Two-Hybrid*“-Systems. Abschnitt vier bezieht sich auf die Funktionsanalyse dieser in Hefe neu identifizierten und für humane Zellen bestätigten p70S6K/TRAF4 Interaktion.

1 Detektion von p53 Mutationen in humanen AML-Zelllinien

Neben der DNA Reparatur ist p53 auch an Cytokin-vermittelten Prozessen, wie Wachstum und Überleben, beteiligt. So kann der Entzug von Wachstumsfaktoren bei Cytokin-abhängigen Zellen zur Apoptoseinduktion führen (Kummer et al., 1997; Tewari et al., 1997). Gerade bei hämatopoietischen Zellen sind Wachstumsfaktoren für die Aufrechterhaltung der Blutzellzahl von großer Bedeutung. Wachstumsfaktoren unterdrücken die Apoptose und darüber hinaus induzieren sie die Proliferation bzw. Reifung der Zellen. Wt p53 Protein ist in der Lage, seine Funktion durch eine Konformationsänderung zu wechseln. Nach Wachstumsfaktorgabe wechselt p53 von der wachstumshemmenden „Suppressor“-Konformation (wt) in die auch bei p53 Genmutationen auftretende proliferationsfördernde Variante, die „Promoter“-Konformation (mut). In der „Promoter“-Konformation wird die Zellteilung gefördert, während apoptotische Prozesse nahezu ausgeschlossen werden, was dazu führt, dass

mutiertes p53 bei der Immortalisierung primärer Tumorzellen eine zentrale Rolle spielt (Milner, 1991; Zhang & Deisseroth 1994). Ritchie und Mitarbeiter (1997) sehen die Funktion von mut p53 eher in der Verhinderung der Apoptose als in der Aufhebung der Proliferationsregulation. Mutationen in der DNA-bindenden Domäne, der sogenannten „Hot-Spot“ Region für Mutationen, bewirken auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren die Annahme der „Promoter“-Konformation von p53 (Milner, 1995; Walker et al., 1999).

Die Hypothese dieser Arbeit war daher, dass alle Cytokin-abhängigen Zelllinien das wt p53 Gen exprimieren und damit in der Lage sind, auf Proteinebene zwischen der wt und der mut Konformation zu wechseln. Während die unabhängigen Zelllinien durchaus p53 Genmutationen tragen können. Die Ergebnisse dazu werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

1.1 Erstellung eines Expressionsprofils von wt oder mut p53 Protein in AML-Zelllinien

Zunächst wurde ein p53 Expressionsschema von 19 AML-Zelllinien mit Hilfe der Western Blot Analyse erstellt. 8 der untersuchten Zelllinien waren Cytokin-abhängig, 11 -unabhängig. Dabei zeigte sich, dass bis auf die Zelllinien HL-60 und KG-1 alle untersuchten Linien p53 Protein exprimieren. Der hier verwendete anti-p53 Antikörper (Ab 7) detektiert sowohl die wt als auch die mut Form des Proteins. Erwähnenswert ist ferner, dass TF-1 Zellen ein p53 von geringerem Molekulargewicht exprimieren als die anderen untersuchten Zelllinien (siehe Abb. III. 1.1.1).

Um zu überprüfen, ob das von TF-1 Zellen exprimierte p53 die wt Konformation hat, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Nach der oben genannten Hypothese von Milner und Mitarbeitern (1991) und Zhang & Deisseroth (1994) sollten Cytokin-abhängige Zelllinien wt p53 exprimieren, wenn die Zellen für einige Zeit ohne Wachstumsfaktoren gehalten werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, auch Cytokin-„gehungerte“ TF-1 Zellen exprimieren ausschließlich die proliferationsfördernde mutante Form des p53 Proteins. Bei der oben genannten Immunpräzipitation macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass einer der verwendeten anti-p53 Antikörper (Ab 3),

ausschließlich die mutante Form detektiert, der zweite (Ab 5) ausschließlich wt p53 (Abb. III. 1.1.2).

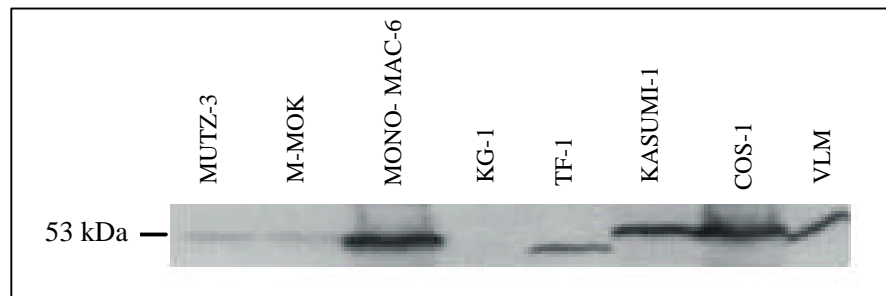


Abb. III. 1.1.1: p53 Expressionsmuster von AML-Zelllinien. Die Detektion erfolgte mit dem anti-p53 Antikörper Ab 7. Dieser Antikörper detektiert wt und mut p53. Die Zelllinien COS-1 und VLM wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Auffallend bei den hier gezeigten Linien: KG-1 exprimiert kein p53 Protein, TF-1 eine kleinere Form von p53.

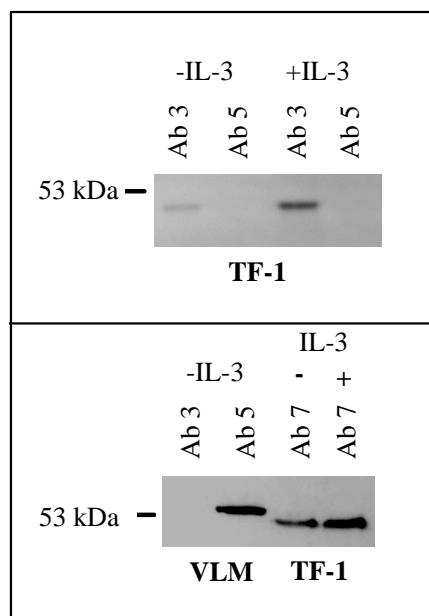


Abb. III. 1.1.2: Immunpräzipitation von mutiertem p53 aus TF-1 Zellen. Oben: p53 wurde mit dem spezifischen anti-p53 Antikörper Ab 3 präzipitiert. Dieser Antikörper detektiert ausschließlich die mut Proteinstruktur. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion mit dem anti-p53 Antikörper Ab 7, der sowohl die wt als auch die mut p53 Konformation detektiert. TF-1 Zellen wurden in serumfreiem Medium (mit 0,1% BSA versetzt) für 18 h „gehungert“, anschließend erfolgte die Stimulation mit IL-3 (10 ng/ml) für 24 h. Unten: VLM Zellen dienen als Positivkontrolle für wt p53, das durch Ab 5 erkannt wird. Unten rechts: Western Blot mit dem anti-p53 Antikörper Ab 7, zur Verdeutlichung der kleineren Größe des von dieser Linie exprimierten p53 Proteins.

1.2 SSCP-Analyse zeigt Veränderungen des p53 Gens in verschiedenen AML-Zelllinien

Die SSCP („single strand conformational polymorphism“)-Analyse ist eine Methode zur Detektion von Nukleotid-Sequenz-Polymorphismen und eignet sich besonders gut zur Aufdeckung von Punktmutationen innerhalb kurzer Genabschnitte (100-300 bp). Wolf

& Rotter (1985) zeigten, dass weniger als 10% mut p53 DNA bei einem Hintergrund von 90% wt p53 DNA detektierbar waren. Zur genauen Lokalisation der mittels SSCP-Analyse entdeckten Veränderungen (s. Abschnitt II. 2.1.16) müssen die entsprechenden cDNA-Fragmente sequenziert werden. p53 cDNA-Bereiche, die die „Hot-Spot“ Region für Mutationen umfassen, wurden mittels PCR amplifiziert (s. Abschnitt II. 2.1.14) und in einer darauffolgenden PCR durch Verwendung von [α - 32 P] dCTP radioaktiv markiert. Für die anschließende SSCP-Analyse wurde das erhaltene PCR-Produkt durch Hitze denaturiert. In der Abbildung III. 1.2.1 ist die p53 cDNA inklusive der für die SSCP-Analysen verwendeten Primer-Positionen schematisch dargestellt.

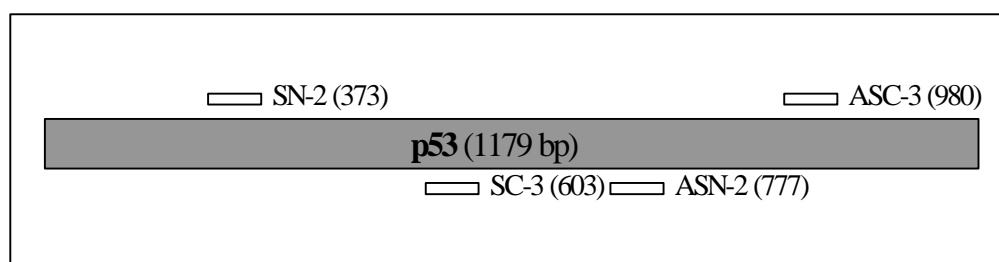


Abb. III. 1.2.1: Schematische Darstellung der p53 cDNA inklusive Primer-Positionen.

Einzelsträngige DNA-Moleküle nehmen Nukleotidsequenz-spezifische Tertiär-Strukturen an. Sind Mutationen vorhanden, äußert sich dies in verändertem Laufverhalten während der Gelelektrophorese unter nichtdenaturierenden Bedingungen. So können schon einzelne Nukleotidinsertionen oder -deletionen detektiert werden. Das per Autoradiographie erhaltene Bandenmuster wurde mit wt p53 Kontrollen verglichen. Als wt Kontrollen wurden die entsprechenden PCR-Produkte der Zelllinien 697 und BV-173 für die Exons 4-9 eingesetzt. Um die Sensitivität der Methode zu überprüfen, wurden zusätzlich Zelllinien der SSCP-Analyse unterzogen, deren Mutationen bereits beschrieben waren (Sugimoto et al., 1992; Matozaki et al., 1995). Neben den Kontrollen wurden 12 der 19 in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien mittels SSCP-Analyse auf Mutationen im p53 Gen untersucht. Für diese 12 Zelllinien waren bis dahin keine Daten bezüglich p53 Mutationen aus der Literatur bekannt. Bei 5/12 Zelllinien (F-36P, M-MOK, MEG-01, MV4-11 und NB-4) zeigten die PCR-Produkte ein verändertes Laufverhalten (Abb. III. 1.2.2 und III. 1.2.3) und wurden anschließend sequenziert.

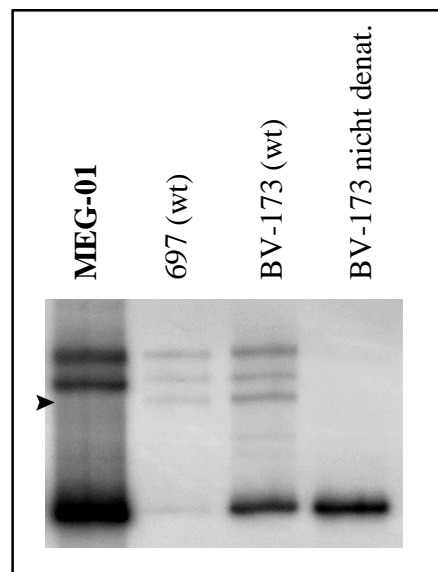


Abb. III. 1.2.2: SSCP-Analyse zur Detektion von p53 Mutationen zwischen den Basenpaaren 373 und 777. cDNA Fragmente wurden mittels PCR in Anwesenheit von [α - 32 P] dCTP amplifiziert und nach Denaturierung im 6%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil verdeutlicht die p53 Mutation der Zelllinie MEG-01, in diesem Fall eine Deletion. 697 und BV-173 wurden als Kontrollen für wt p53 mitgeführt. Zusätzlich wurde eine nicht denaturierte Probe von BV-173 aufgetragen.

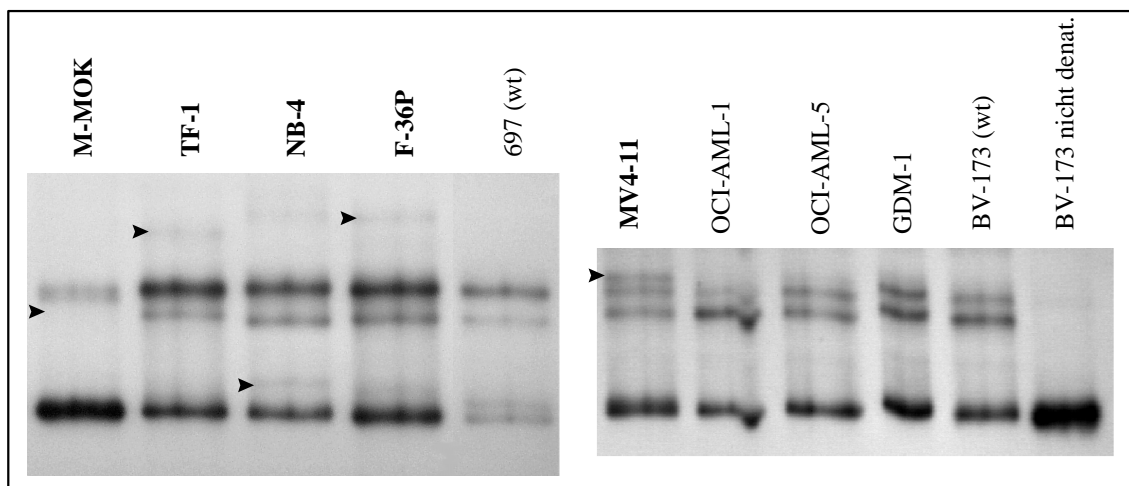


Abb. III. 1.2.3: SSCP-Analyse zur Detektion von p53 Mutationen. cDNA Fragmente zwischen den Basenpaaren 603 und 980 wurden mittels radioaktiver PCR in Anwesenheit von [α - 32 P] dCTP amplifiziert und nach Denaturierung im 6%-igen Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pfeile verdeutlichen die Mutationen der Zelllinien M-MOK, TF-1, NB-4, F-36P und MV4-11. 697 und BV-173 wurden als Kontrolle für wt p53 mitgeführt.

Die Sequenzierungen bestätigten die Ergebnisse der SSCP-Analyse. Die megakaryocytaire Zelllinie MEG-01 zeigt eine Triplettdelation des Codons 304 (Exon 7), infolgedessen wird die Aminosäure (AS) Histidin an dieser Stelle nicht gebildet. F-36P, MV4-11 und NB-4 tragen Punktmutationen am Codon 344 (Exon 9), wobei die Base Adenin in Guanin (CAT→CGT) getauscht wird, was dazu führt, dass Arginin anstelle von Histidin synthetisiert wird. F-36P hat eine zweite Punktmutation am Codon 270 (Exon 6), wobei ein Adenin gegen ein Thymidin ausgetauscht wurde. Diese Mutation bewirkt keinen AS Austausch. Auch NB-4 trägt eine zusätzliche Mutation am Codon 319 (Exon 7), die CGG zu CAG umwandelt, dabei wird Arginin durch Glutamin ersetzt. M-MOK hat eine Mutation am Codon 191 (Exon 4), wobei Lysin durch Asparagin ausgetauscht wird (Tab. III. 1). Die neu detektierten Mutationen sind im Bereich der DNA-Bindungsdomäne von p53 lokalisiert, diese Region ist als „Hot-Spot“ für Mutationen im p53 Gen bekannt (Walker et al., 1999). Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung des kodierenden Stranges gezeigt und durch Sequenzierung des nicht kodierenden Stranges bestätigt.

Zelllinie	Sequenz	Genabschnitt
wt p53	5'- ACC ATC CAC TAC AAC -3'	
MEG-01	5'- ACC ATC XXX TAC AAC -3'	Codon 304; Exon 7
wt p53	5'- GAG GTG CAT GTT TGT -3'	
MV4-11	5'- GAG GTG CGT GTT TGT -3'	Codon 344; Exon 9
NB-4	5'- GAG GTG CGT GTT TGT -3'	Codon 344; Exon 9
F-36P	5'- GAG GTG CGT GTT TGT -3'	Codon 344; Exon 9
wt p53	5'- ATG AAC CGG AGG CCC -3'	
NB-4	5'- ATG AAC CAG AGG CCC -3'	Codon 319; Exon 7
wt p53	5'- GTG GAA GGA AAT TTG -3'	
F-36P	5'- GTG GAA GGT AAT TTG -3'	Codon 270; Exon 6
wt p53	5'- GCC AAG TCT GTG GTG -3'	
M-MOK	5'- GCC AAC TCT GTG GTG -3'	Codon 191; Exon 4

Tab. III. 1: Sequenzvergleich zwischen wt und mut p53 der Zelllinien MEG-01, MV4-11, NB-4, F-36P und M-MOK. Die Mutationen sind durch fettgedruckte Buchstaben hervorgehoben. XXX = Deletion.

1.3 p53 Mutationen kommen in Cytokin-abhängig und -unabhängig wachsenden AML-Zelllinien vor

12 der 19 mittels Immunoblot auf p53 Expression getesteten AML-Zelllinien wurden, wie bereits erwähnt, der SSCP-Analyse unterzogen, um mögliche Mutationen im p53 Gen zu detektieren. Anschließend wurden diese Ergebnisse mit denen 7 weiterer Zelllinien verglichen, deren p53 Mutationen bereits in der Literatur beschrieben waren. Zur besseren Übersicht siehe Tabelle III. 2.

Zelllinie	Zelltyp	Cytokin-Ab- hängigkeit	p53 wt / mut (SSCP)	Codon (Sequenzierung)
GDM-1	myelocytär	unabhängig	wt	–
HL-60	myelocytär	unabhängig	del	–
HU-3	megakaryocytär/ erythroid	unabhängig	wt	–
KASUMI-1	myelocytär	unabhängig	wt	–
KG-1	myelocytär	unabhängig	mut	224/225
MEG-01	megakaryocytär	unabhängig	mut	304
ML-2	monocytär	unabhängig	wt	–
MONO-MAC-6	monocytär	unabhängig	wt	–
MV4-11	monocytär	unabhängig	mut	344
NB-4	promyelocytär	unabhängig	mut	319/344
THP-1	monocytär	unabhängig	mut	174
F-36P	erythroid	abhängig	mut	270/344
M-07e	megakaryocytär	abhängig	wt	–
M-MOK	megakaryocytär	abhängig	mut	191
MUTZ-3	monocytär	abhängig	wt	–
OCI-AML-1	myelocytär	abhängig	wt	–
OCI-AML-5	myelocytär	abhängig	wt	–
SKNO-1	myelocytär	abhängig	mut	248/368
TF-1	erythroid	abhängig	mut	251

Tab. III. 2: Übersichtstabelle der auf p53 Mutationen getesteten AML-Zelllinien.
Die fettgedruckten Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels SSCP-Analyse untersucht. Der p53 Status der anderen Zelllinien wurde aus Literaturdaten übernommen. Abkürzungen: wt: wildtyp; mut: mutiert; del: deletiert.

7 der 12 untersuchten Zelllinien waren Cytokin-unabhängig, davon haben 3 Zelllinien Mutationen im p53 Gen. 5 der 12 Zelllinien waren Cytokin-abhängig, 2 davon wiesen p53 Veränderungen auf. Insgesamt tragen 5 der 12 in Betracht gezogenen AML-Zelllinien Mutationen im p53 Gen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass p53 Mutationen sowohl in Cytokin-abhängigen als auch in -unabhängigen Zelllinien auftreten.

2 Einfluß Cytokin-induzierter Signaltransduktion auf proliferative Prozesse hämatopoietischer Zellen

Die Signaltransduktionswege Ras/Raf/MAPK, PI-3K/p70S6K und JAK/STAT haben in proliferativen und anti-apoptotischen Prozessen hämatopoietischer Zellen eine große Bedeutung. In dieser Arbeit sollten Wachstumsfaktor-abhängige Zelllinien untersucht werden, die aus Zellen der myeloischen Reihe hervorgegangen sind. Werden diesen Zellen die zum Überleben notwendigen Wachstumsfaktoren entzogen, kommt es zum Proliferationsstop, die Zellen sterben. Wachstumsfaktor-Abhängigkeit ist daher eine Eigenschaft, die für Untersuchungen proliferativer Effekte gut geeignet ist. Um zu untersuchen, inwiefern die oben genannten Signaltransduktionswege in proliferative sowie anti-apoptotische Prozesse eingreifen, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt, die die jeweiligen Signaltransduktionskaskaden an definierten Stellen unterbrechen. Mit Hilfe von Proliferationsassays sollte der Einfluß der einzelnen Signaltransduktionswege verdeutlicht werden. Desweiteren sollte geklärt werden, ob es generelle Unterschiede bezüglich proliferativer bzw. anti-apoptotischer Prozesse nach Stimulation mit Cytokinen gibt, die verschiedene Rezeptorklassen aktivieren.

2.1 Spezifitätsanalyse von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege

Zunächst sollte die Spezifität der Inhibitoren PD98059 (Inhibitor der MAPKK), Rapamycin (Inhibitor des FRAP/mTOR Proteins, „upstream“ der p70S6K) und AG-490 (JAK2 Tyrosin-Kinase Inhibitor) überprüft werden (siehe Abb. I. 3). Die verwendeten

Hemmstoffe unterbrechen die einzelnen Signaltransduktionsketten durch Inaktivierung von Kinasen und die damit verbundene Phosphatübertragung. Zu diesem Zwecke wurden M-07e Zellen mit IL-3 stimuliert. Die Aktivierung der einzelnen Signalwege wurde durch Nachweis der Phosphorylierung der Kinasen oder ihrer Substrate gezeigt. Hierfür wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt. IL-3 bewirkte eine Phosphorylierung der MAPK (Erk-1,2) (siehe Abb. III. 2.1.1), der p70S6K (siehe Abb. III. 2.1.2) und von STAT5 (siehe Abb. III. 2.1.3). Die Spezifität des MAPK Inhibitors PD98059 zeigt die Abbildung III. 2.1.1. Bei Einsatz dieser Substanz und zusätzlicher Stimulation mit IL-3, wurde die Phosphorylierung der MAPK (Erk-1,2) verhindert. Die beiden anderen Inhibitoren hemmen diese Phosphorylierung nicht.

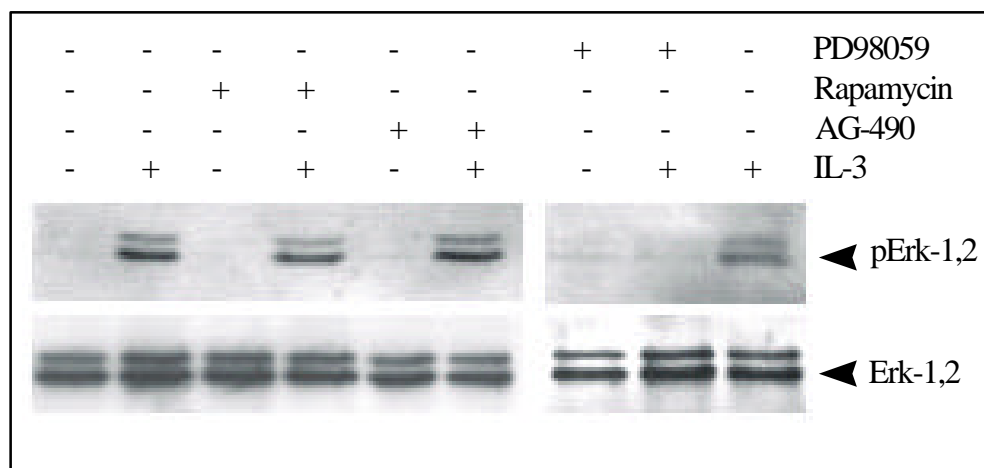


Abb. III. 2.1.1: Immunoblot zur Detektion von phosphorylierter MAPK (Erk-1,2). M-07e Zellen wurden für 18 h in serumfreiem RPMI 1640-Medium und 0,1% BSA gehalten, dann für 1 h mit Rapamycin (10 nM), PD98059 (10 μ M) oder AG-490 (10 μ M) inkubiert. Nach Zugabe von IL-3 (10 ng/ml) für 15 min wurden die Zellen lysiert. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und pErk-1,2 bzw. Erk-1,2 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert. Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (Erk) ist ein anderer Terminus für Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase.

Rapamycin hingegen verhindert spezifisch die Phosphorylierung der p70S6K (siehe Abbildung III. 2.1.2). Wie erwartet beeinflusst der MAPK Inhibitor PD98059 die Phosphorylierung der p70S6K nicht. Diese Analysen bestätigen die Spezifität der Substanzen PD98059 und Rapamycin, da sie den jeweils anderen Signaltransduktionsweg nicht beeinflussen.

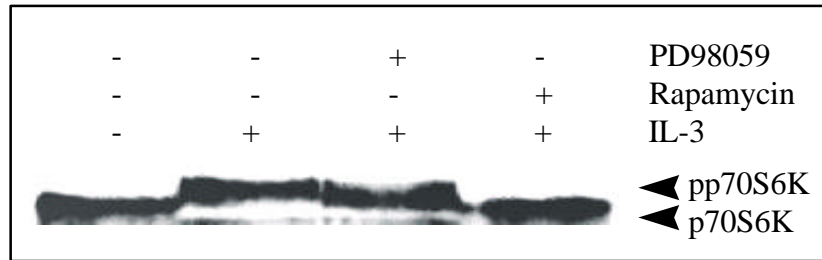


Abb. III. 2.1.2: Immunoblot zur Detektion von phosphorylierter p70S6K. Die Inhibition und Stimulation erfolgte analog zur Legende der Abb. III. 2.1.1. Rapamycin verhindert spezifisch die Phosphorylierung der p70S6K. Die phosphorylierte Kinase verhält sich während der gelelektrophoretischen Auftrennung anders als nicht phosphoryliertes Protein und kann durch einen „Shift“ im Gel von der nicht phosphorylierten Form unterschieden werden. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und p70S6K mittels spezifischem Antikörper im Immunoblot detektiert.

Die Phosphorylierung von STAT5 durch JAK2 kann als Parameter für die Aktivierung des JAK/STAT Signaltransduktionsweges betrachtet werden. Für die Inhibition dieses Weges sollte der Inhibitor AG-490 eingesetzt werden. Auch bei suboptimalen IL-3 Konzentrationen ließ sich der JAK/STAT Weg nicht oder nur in geringem Maß durch AG-490 hemmen (siehe Abb. III. 2.1.3). Daher konnte dieser Hemmstoff für weitere Versuche nicht verwendet werden.

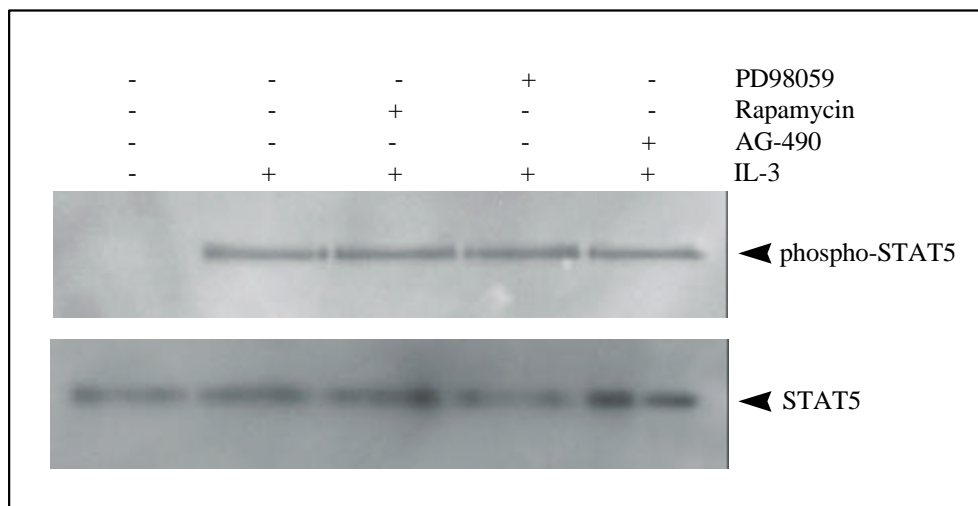


Abb. III. 2.1.3: Immunoblot zur Detektion von phosphoryliertem STAT5. M-07e Zellen wurden analog, wie in der Legende der Abb. III. 2.1.1 beschrieben, behandelt. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und STAT5 bzw. phospho-STAT5 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert. Die Phosphorylierung von STAT5 wurde durch AG-490 nicht verhindert.

2.2 Bestimmung des Aktivierungszeitpunktes der MAPK (Erk-1,2) und der p70S6K

Da in der Literatur unterschiedliche Stimulationszeiten beschrieben sind, die zur Aktivierung der MAPK (Erk-1,2) bzw. der p70S6K benötigt werden (Chou & Blenis, 1996), sollte ein genauer Zeitpunkt für die optimale Detektion durch Kinetiken mittels Kurz- (0 bis 30 min) bzw. Langzeitstimulation (0 bis 24 h) mit IL-3 bestimmt werden. Nach 18-stündiger Inkubation der Zellen in Cytokin-freiem Medium, wurden die Kinetiken gestartet. Das „Hungern“ der Zellen ist nötig, um die an den Signaltransduktionswegen beteiligten Enzyme in nichtphosphorylierter Form zu halten. Die Phosphorylierungen der MAPK (Erk-1,2) und p70S6K wurden mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen und sind in den Abbildungen III. 2.2.1 und III. 2.2.2 dargestellt.

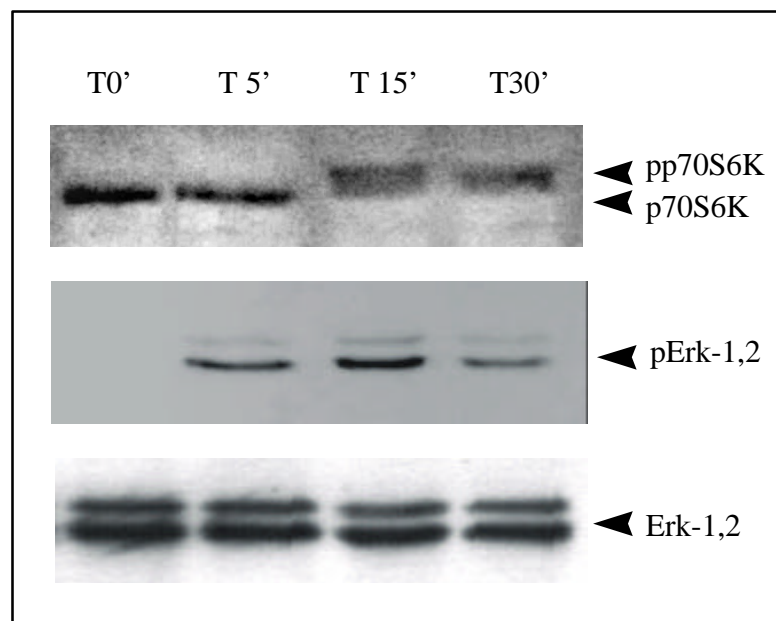


Abb. III. 2.2.1: Kinetik zur Ermittlung des Phosphorylierungszeitpunktes.

M-07e Zellen wurden für 18 h in serumfreiem RPMI 1640-Medium und 0,1% BSA gehalten, dann für 0, 5, 15 und 30 min mit IL-3 (10 ng/ml) stimuliert. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und p70S6K bzw. pp70S6K (oben), phospho-Erk-1,2 (Mitte) und Erk-1,2 (unten) mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert. Nach 15 min ist p70S6K phosphoryliert; Erk-1,2 bereits nach 5 min.

Für die Aktivierung der MAPK waren 5 min ausreichend, während die p70S6K erst nach 15 min phosphoryliert wurde. Aus den Langzeitstimulationen (siehe Abb. III. 2.2.2) mit IL-3 wurde deutlich, dass nach der ersten Phosphorylierung noch eine zweite Phosphorylierung beider Kinasen nach 9 h folgte. Es ist anzunehmen, dass die erste Phosphorylierung die Zellen zur Produktion weiterer Cytokine veranlaßt, die wiederum als Stimulantien für die zweite Aktivierung angesehen werden können. Für TNF- α induzierte Proliferation konnte ein sekundärer Effekt dieser Art mit der Synthese von GM-CSF für TF-1 Zellen gezeigt werden. In diesem Fall wirkt GM-CSF als Effektor der TNF- α induzierten Proliferation (Quentmeier et al., 2000).

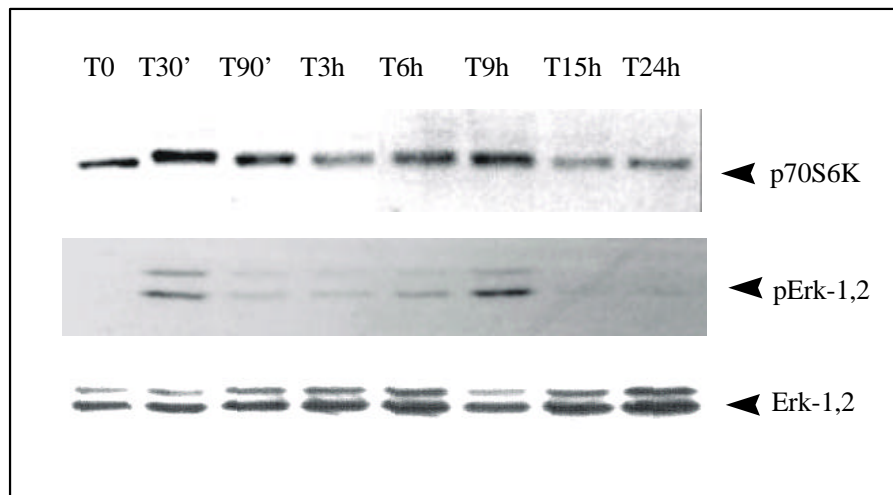


Abb. III. 2.2.2: Kinetik zur Ermittlung des Phosphorylierungszeitraums.

Beide Kinasen waren nach 30 min Stimulation mit IL-3 (10 ng/ml) phosphoryliert. Die Phosphorylierung nahm anschließend ab und erreichte nach 9 h einen zweiten Peak. Nach 15 h lagen beide Kinasen wieder in inaktiver Form vor. Die Proteinextrakte wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und p70S6K sowie im Gel höher laufende phospho-p70S6K (oben), phospho-Erk-1,2 (Mitte) und Erk-1,2 (unten) mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert.

Neben der Ermittlung der optimalen Stimulationszeit sollte zusätzlich analysiert werden, ob eine einmalige Gabe von IL-3 ausreichend ist, um die Zellen zur Proliferation anzuregen, oder ob der Stimulus während der gesamten Zeit auf die Zellen einwirken muß. Mit Hilfe eines inhibierenden anti-IL-3 Antikörpers konnte freies oder wieder vom Rezeptor diffundiertes IL-3 gebunden werden. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9 und 24 h wurden die Zellen jeweils mit dem anti-IL-3 Antikörper versetzt. 46 h nach Stimulation mit IL-3 wurde den Zellen [3 H]-Thymidin zugesetzt. Nach Zellernte

erfolgte die Messung des [^3H]-Thymidin-Einbaus im Scintillationszähler. Die Daten hierzu sind in der Abbildung III. 2.2.3 als Säulendiagramm dargestellt.

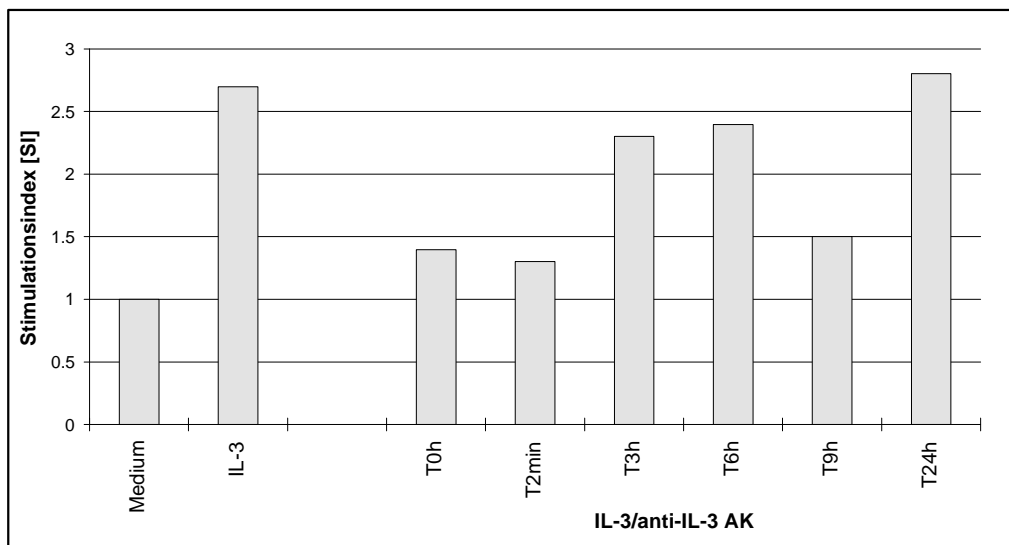


Abb. III. 2.2.3: [^3H]-Thymidin-Assay mit inhibierendem anti-IL-3 Antikörper.

M-07e Zellen wurden für 18 h in serumfreiem RPMI 1640-Medium und 0,1% BSA gehalten, dann mit IL-3 (1 ng/ml) stimuliert. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9 und 24 h wurden jeweils anti-IL-3 Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Für die letzten 2 h wurde jeder Ansatz mit 1 μCi [^3H]-Thymidin versetzt. Die Ergebnisse wurden als Stimmulationsindex (SI) auf die unbehandelten Kontrollzellen (SI=1) bezogen. Das Diagramm zeigt die Daten eines repräsentativen Versuchs.

Die aus den [^3H]-Thymidin-Assays resultierenden Daten lassen darauf schließen, dass ein einmaliges Signal auf den Rezeptor ausreichend ist, um die Signaltransduktionen zu aktivieren, die schließlich zur Proliferation führen. Bei gleichzeitiger Stimulation und Inhibition (T 0 h) kommt es zu einer partiellen Proliferationshemmung. Dies war auch bei nachträglicher Gabe des inhibierenden Antikörpers (nach 2 min) zu beobachten. Nach 3 h traten kaum noch Effekte des inhibierenden Antikörpers auf. Das ist ein Hinweis darauf, dass in diesem Zeitraum alle für das Wachstum notwendigen Signale vermittelt wurden. Unklar bleibt allerdings, warum eine Antikörpergabe nach 9 h Stimulation mit IL-3 zu reduziertem [^3H]-Thymidin Einbau führte. Da diese Werte reproduziert wurden, muß es eine Bedeutung geben, über die zur Zeit nur spekuliert werden könnte.

2.3 Einfluß von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege auf die Proliferation myeloischer Zellen

Nach Ermittlung der Spezifität der Inhibitoren und Festlegung der optimalen Stimulationszeit wurden diese Substanzen für Proliferationsassays eingesetzt, um die Bedeutung der Ras/Raf/MAPK- und PI-3K/p70S6K- Signaltransduktionswege an der Proliferation myeloischer Zellen zu ermitteln. Diese Versuche wurden mit Hilfe von [^3H]-Thymidin-Assays und Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid gefärbten Zellen im Durchflußcytometer durchgeführt (siehe Abschnitt II. 2.5.1).

Resultat der [^3H]-Thymidin-Assays war, dass die Proliferation IL-3 stimulierter Zellen bei inhibierter p70S6K (d.h. unter Verwendung von Rapamycin) um etwa die Hälfte reduziert wurden (53% bei M-07e Zellen, 41% bei TF-1 Zellen) (siehe Abb. III. 2.3.1). Der MAPK Hemmstoff PD98059 hingegen bewirkte eine deutlich geringere Proliferationshemmung (13% bei M-07e Zellen, 22% bei TF-1). Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Messungen nach IL-3 Stimulation. Mit GM-CSF stimulierte Zellen verhalten sich ähnlich wie die mit IL-3 stimulierten Zellen.

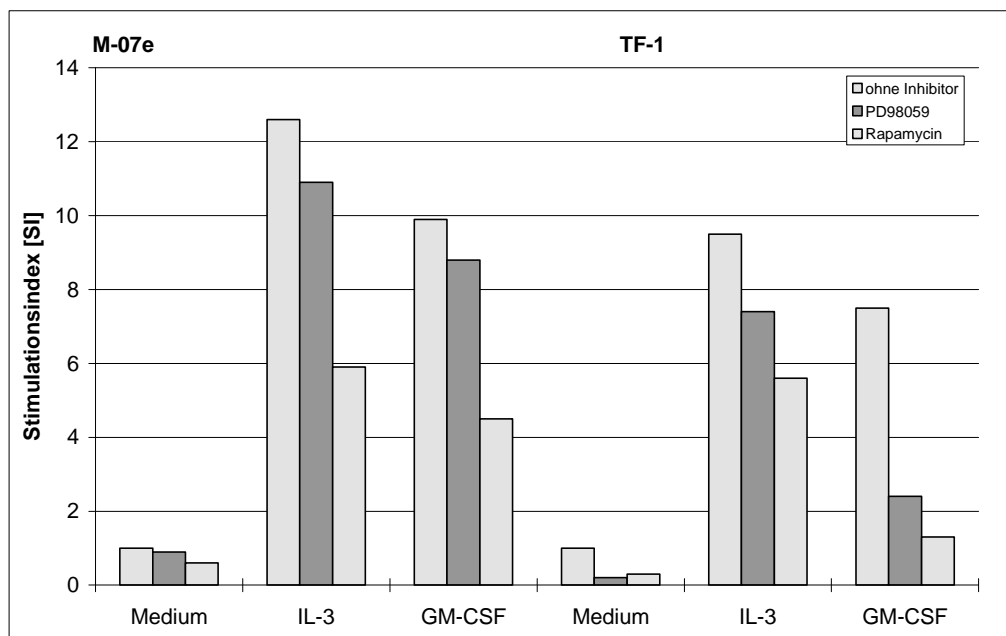


Abb. III. 2.3.1: Einfluß von Inhibitoren verschiedener Signaltransduktionswege auf das Wachstum von M-07e und TF-1 Zellen. Die Zellen wurden für 18 h in serumfreiem RPMI 1640-Medium mit 0,1% BSA gehalten, dann für 1 h mit Rapamycin (10 nM) bzw. PD98059 (10 μM) inkubiert. Nach Zugabe von IL-3 (10 ng/ml) bzw. GM-CSF (10 ng/ml) erfolgte eine weitere Inkubation für 48; für die letzten 3 h wurde jeder Ansatz mit 1 μCi [^3H]-Thymidin versetzt. In den verwendeten Konzentrationen zeigten die Inhibitoren im Einzelnen weder proliferative noch apoptotische Effekte.

Die Zellzyklusanalysen mit Propidiumiodid bestätigten die bereits in den [^3H]-Thymidin-Assays ermittelte Wachstumsreduktion bei M-07e Zellen. Bei dieser Methode wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die sich in der G0/G1- bzw. in der S/G2/M-Phase befinden. Nach Cytokin-Entzug waren ca. 9% der Zellen in der S/G2/M-Phase, der Zellzyklus wurde arretiert (siehe Abb. III. 2.3.2 A). Die Stimulation mit IL-3 bewirkte einen Proliferationsschub, wobei ca. 31% der Zellen die S/G2/M-Phase erreichten (siehe Abb. III. 2.3.2 B). Bei Einsatz des p70S6K Inhibitors Rapamycin hingegen wurden über 50% der stimulierten Zellen am Fortschreiten des Zellzyklusses gehindert (Abb. III. 2.3.2 C), bei PD98059 fast 40% (D). Die Prozentzahlen errechnen sich unter Berücksichtigung der Grundstimulation von 9% in Cytokin-„gehungerten“ Zellen (A).

Daraus wird nochmals deutlich, dass die aktivierte p70S6K einen stärkeren Einfluß auf die Proliferation von M-07e Zellen hat, als die MAPK (Erk-1,2). TF-1 Zellen wurden aufgrund ihrer hohen Sterblichkeitsrate in serumfreiem Medium nicht untersucht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle bei der durch IL-3 induzierten Proliferation spielt. Neben dem PI-3K/p70S6K-Weg ist, wenn auch schwächer, auch der Ras/Raf/MAPK-Weg für die IL-3 bzw. GM-CSF induzierte Proliferation verantwortlich. Diese Versuche wurden durch dreimalige Messungen verifiziert, in den Abbildungen III. 2.3.1 und III. 2.3.2 ist jeweils ein repräsentativer Ansatz dargestellt.

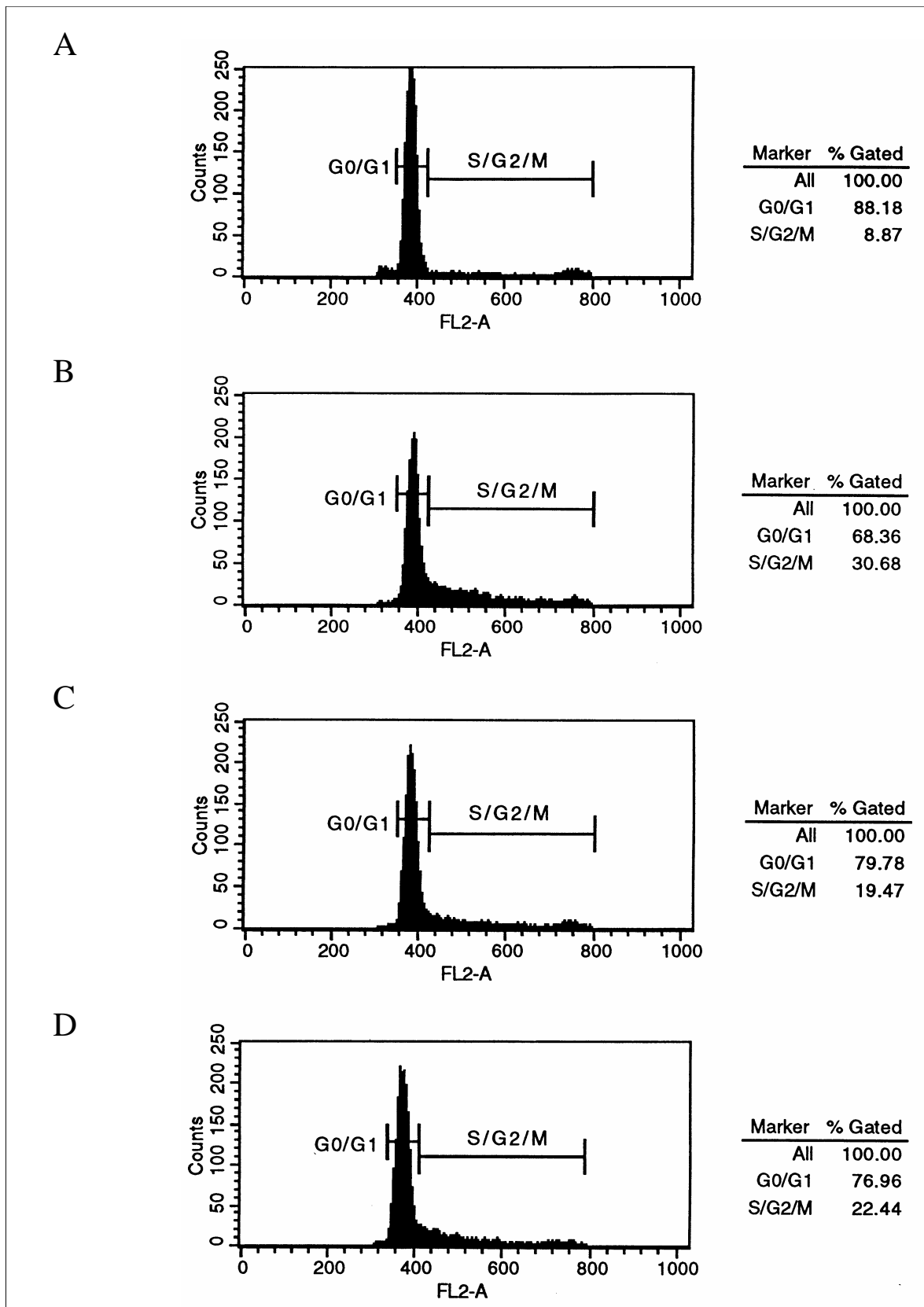


Abb. III.2.3.2: Propidiumiodidanalyse zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten von M-07e Zellen. (A) Mediumkontrolle, 24 h Inkubation, (B) Stimulationskontrolle, Zellen wurden mit IL-3 (10 ng/ml) für 24 h behandelt. Die Zellen der Ansätze C und D wurden zusätzlich für 1 h mit Rapamycin (10 nM) (C) bzw. PD98059 (10 μ M) (D) präinkubiert und anschließend mit IL-3 stimuliert.

2.4 Der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg vermittelt anti-apoptotische Signale

Mit Hilfe des Annexin V-Apoptose-Assays (siehe II. 2.5.3) sollte geklärt werden, ob die durch Cytokine aktivierten MAPK (Erk-1,2) oder p70S6K ausschließlich an proliferativen Prozessen oder auch an anti-apoptotischen Vorgängen beteiligt sind. Ein früher Indikator für Apoptose ist die Zunahme des prozentualen Anteils der Zellen, die auf der Außenseite der Membran FITC-markiertes Annexin V binden können. Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserine, die bei intakter Zellmembran an der Innenseite der Phospholipiddoppelschicht lokalisiert sind und erst bei eintretender Apoptose an die Membran-Außenseite wechseln. Im Vergleich dazu, kann Propidiumiodid, ein Farbstoff, der fluoresziert wenn er an DNA bindet, erst im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose, wenn die Membranen instabil werden, in den Kern gelangen und detektiert werden.

Die Versuche wurden auf TF-1 Zellen beschränkt, weil bei diesen Zellen die Apoptose nach Wachstumsfaktor-Entzug relativ schnell induziert wird. Bei den Cytokin-„gehungerten“ Zellen waren zum Zeitpunkt der Messungen 5% lebende Zellen vorhanden. 58% der mit GM-CSF stimulierten Zellen lebten und zeigten keinerlei apoptotische Merkmale. Beim Vergleich dieses Ansatzes (s. Tab. III. 3, Zeile 4), mit dem Ansatz, in dem die MAPK (Erk-1,2) zusätzlich durch PD98059 gehemmt war, erreichten 19% mehr Zellen das apoptotische Stadium (s. Tab. III. 3, Zeile 6). Bei der durch Rapamycin inhibierten p70S6K (s. Tab. III. 3, Zeile 5) befanden sich 11% mehr Zellen in der Apoptose verglichen mit den Ansätzen, in denen die p70S6K aktiv war (s. Tab. III. 3, Zeile 4). Die Prozentzahlen beziehen sich auf früh- und spät-apoptotische Zellen.

Diese Daten weisen darauf hin, dass sowohl der PI-3K/p70S6K- als auch der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg anti-apoptotische Signale vermittelt. Während der PI-3K/p70S6K-Weg für Cytokin-induzierte Proliferation von großer Bedeutung ist, scheint hier der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg eine größere Rolle zu spielen.

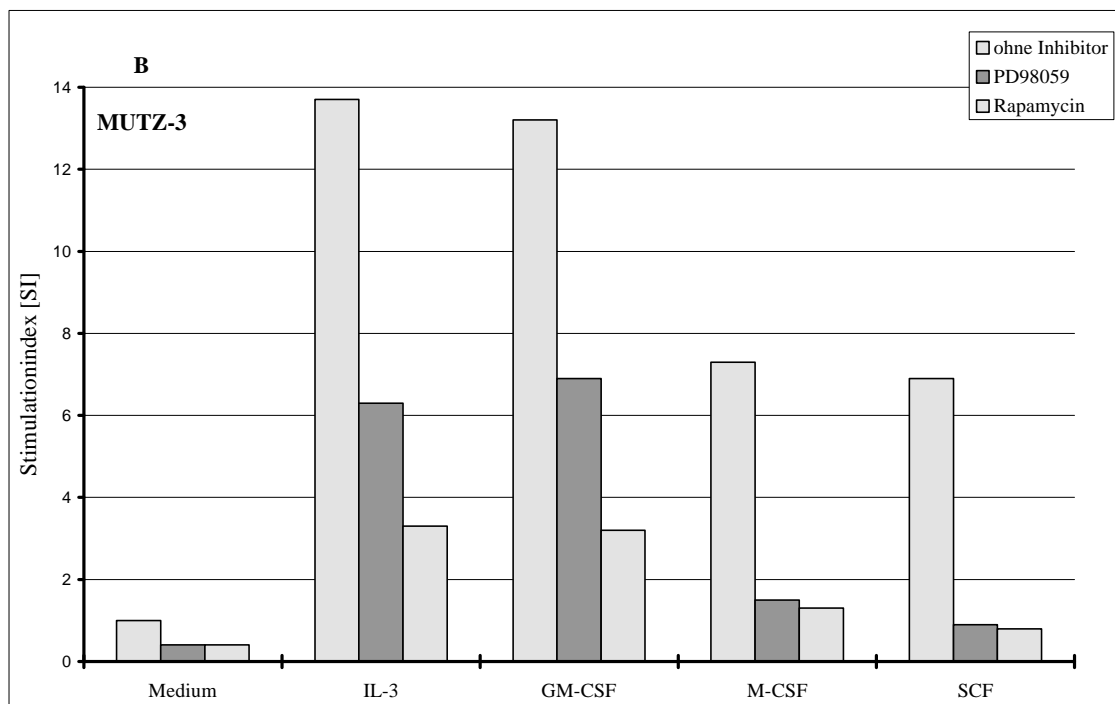
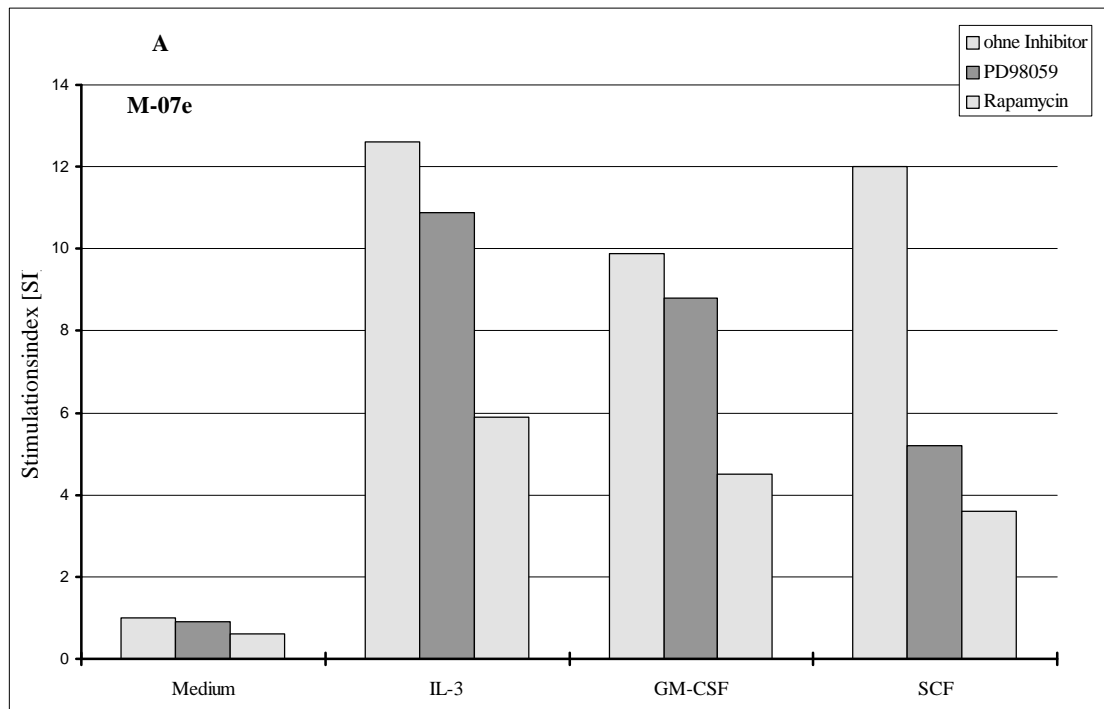
	<i>Annexin V⁻/PI⁻</i>	<i>Annexin V⁺/PI⁻</i>	<i>Annexin V⁺/PI⁺</i>
ohne Inhibitor	5%	52%	43%
Rapamycin	3%	47%	50%
PD98059	5%	56%	39%
GM-CSF	58%	12%	30%
Rapamycin/ GM-CSF	47%	16%	37%
PD98059/ GM-CSF	39%	22%	39%

Tab. III. 3: *TF-1 Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 0,1% BSA ausgesät und mit Rapamycin (10 nM) bzw. PD98059 (10 µM) für 1 h inkubiert, anschließend erfolgte die Stimulation mit GM-CSF (2 ng/ml) für 24 h. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Die Daten sind als % positive Zellen nach Messung am Durchflußcytometer dargestellt. Lebende Zellen sind Annexin V/PI⁻, früh apoptotische Zellen Annexin V⁺/PI⁻ und spät apoptotische Annexin V⁺/PI⁺. Die Mediumkontrollen (Zeilen 2 und 3) zeigen, dass die Inhibitoren allein weder proliferative noch apoptotische Effekte auf die Zellen haben.*

2.5 Stimulation mit Cytokinen, die an Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie und Rezeptortyrosinkinasen binden

Aus den bisherigen Ergebnissen wurde deutlich, dass die p70S6K eine entscheidende Funktion bei Proliferationsvorgängen myeloischer Zellen hat, wenn Cytokine verwendet wurden, die an Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie binden. Daraufhin sollte untersucht werden, ob dieser Signaltransduktionsweg auch durch Cytokine aktiviert werden kann, die zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (FLT3-L, M-CSF, SCF) gehören. Neben M-07e und TF-1 wurden zwei weitere Zelllinien, MUTZ-3 und OCI-AML-5, für diese Experimente ausgewählt, um die Repräsentativität der Ergebnisse zu erhöhen.

Alle untersuchten Linien ließen sich sowohl durch Cytokine stimulieren, die an Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie binden (GM-CSF, IL-3), als auch durch Cytokine, die Rezeptortyrosinkinasen aktivieren (FLT3-L, M-CSF, SCF). Die Daten hierzu sind in den Diagrammen der Abbildung III. 2.5.1 (A-D) zusammenfassend dargestellt.



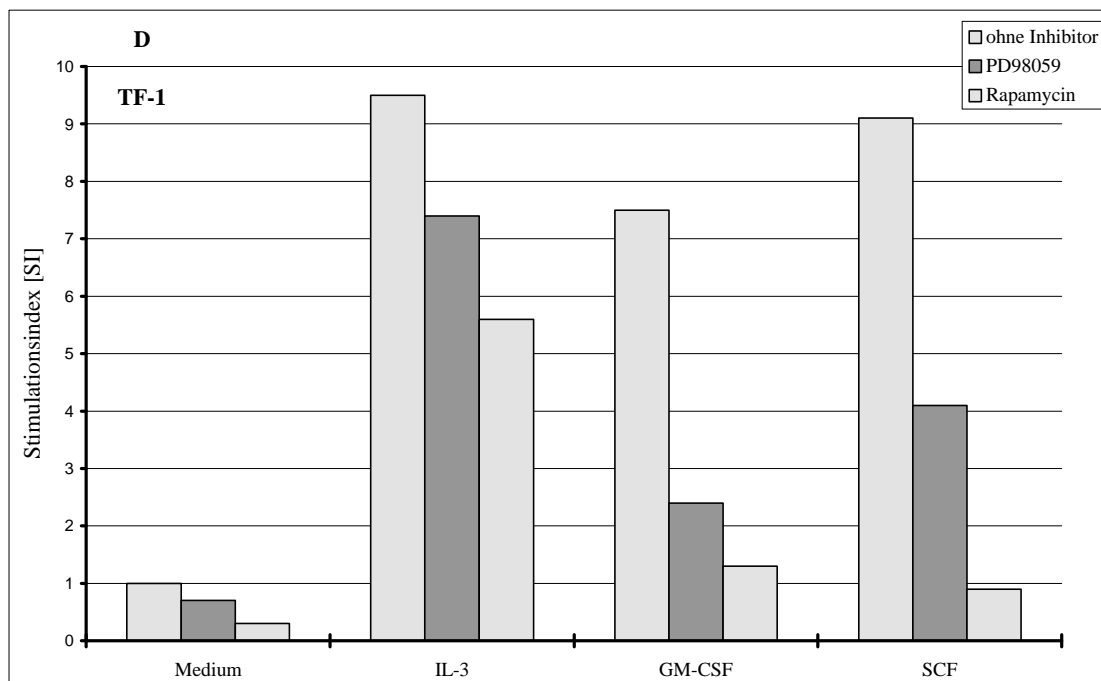
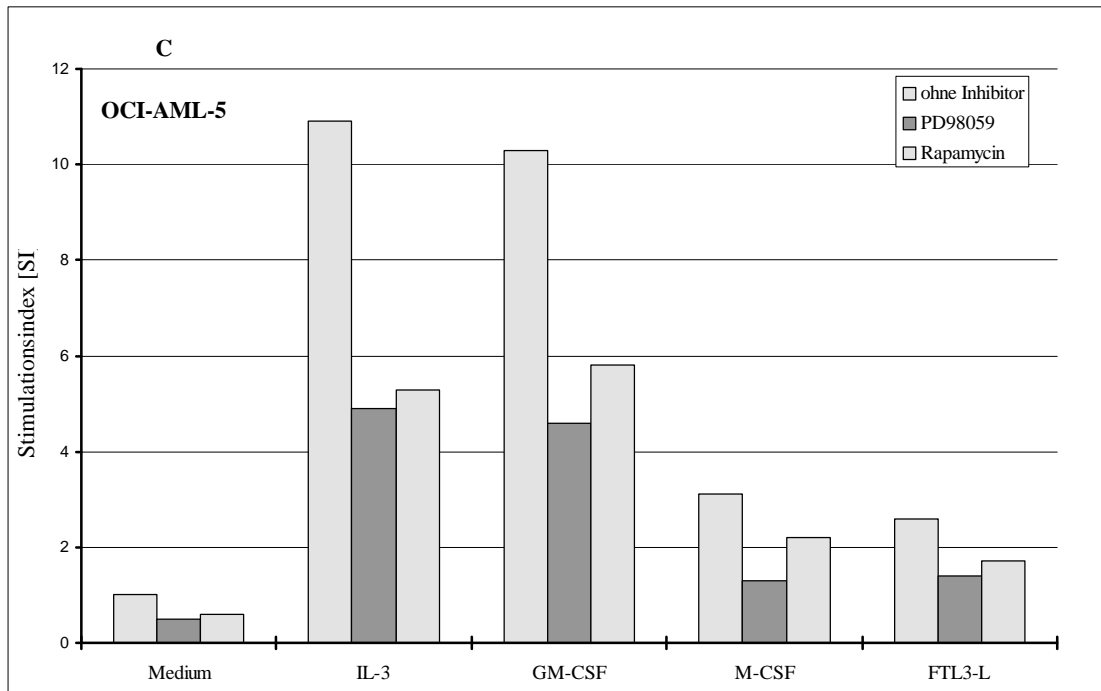


Abb. III. 2.5.1: [^3H]-Thymidin-Assay zur Ermittlung inhibitorischer Effekte von PD98059 und Rapamycin bei Einsatz unterschiedlicher Cytokine. (A) M-07e, (B) MUTZ-3, (C) OCI-AML-5 und (D) TF-1 Zellen wurden für 18 h in serumfreiem RPMI 1640-Medium und 0,1% BSA gehalten, dann für 1 h mit Rapamycin (10 nM) oder PD98059 (10 μM) inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit IL-3 (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), M-CSF (10 ng/ml), FLT3-L (10 ng/ml) oder SCF (20 ng/ml) für 48 h. 3 h vor der Zellernte wurde jeder Ansatz mit 1 μCi [^3H]-Thymidin versetzt.

Die hier ermittelten Daten bestätigen auch für die Zelllinie MUTZ-3 die bereits für M-07e und TF-1 erhaltenen Ergebnisse. Nach Stimulation mit Cytokinen beider Rezeptorklassen reagierten alle 4 untersuchten Zelllinien mit Proliferation. Nach Zugabe der MAPK (Erk-1,2) und p70S6K Hemmstoffe kam es zur Proliferationsreduktion.

Nach Stimulation mit IL-3 wurde bei den Zelllinien M-07e, OCI-AML-5 und TF-1 unter Einsatz des Inhibitors Rapamycin und damit inhibierter p70S6K eine Wachstumshemmung um etwa die Hälfte beobachtet. Bei der Zelllinie MUTZ-3 sogar um mehr als 75% (siehe Tab. III. 4). Bei inaktiver MAPK, unter Verwendung von PD98059, wurde die Proliferation bei M-07e und TF-1 Zellen um etwa ein Drittel reduziert, bei den Linien MUTZ-3 und OCI-AML-5 sogar um mehr als die Hälfte. Nach Stimulation mit SCF (Rezeptortyrosinkinase-Aktivator) und Inhibition der p70S6K reagierten die Zelllinien M-07e, MUTZ-3 und TF-1 mit einer Proliferationsreduktion von mehr als 70%, bei gehemmter MAPK um etwa die Hälfte, während MUTZ-3 Zellen mit über 80% am stärksten reagierten. In einer der vier untersuchten Zelllinien (OCI-AML-5) hat der Ras/Raf/MAPK-Weg einen größeren Einfluß auf die Cytokin-induzierte Proliferation, als die PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion. Nach Stimulation mit IL-3, kam es zu 55% Reduktion durch PD98059 bzw. 51% Reduktion durch Rapamycin. Noch deutlicher ist der Unterschied nach Stimulation mit FLT-3L bzw. M-CSF. Allgemein bestätigt sich jedoch, dass beide Signaltransduktionswege für beide Rezeptorklassen eine prominente Funktion bei der Induktion der Proliferation einnehmen.

Cytokin	Inhibitor	M-07e	MUTZ-3	OCI-AML-5	TF-1
GM-CSF	PD98059	11%	48%	55%	68%
GM-CSF	Rapamycin	55%	76%	44%	83%
IL-3	PD98059	13%	54%	55%	22%
IL-3	Rapamycin	53%	76%	51%	41%
FLT3-L	PD98059	-	-	46%	-
FLT3-L	Rapamycin	-	-	35%	-
M-CSF	PD98059	-	79%	58%	-
M-CSF	Rapamycin	-	82%	29%	-
SCF	PD98059	57%	87%	-	55%
SCF	Rapamycin	70%	88%	-	90%

Tab. III. 4: Übersichtstabelle zur Proliferationsreduktion. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die in [^3H]-Thymidin-Assays ermittelte Reduktion der Proliferation, verglichen mit den Ansätzen ohne Inhibitoren (@ 100%). - = nicht untersucht.

3 Identifizierung der Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4

Die p70S6K aktiviert das ribosomale S6 Protein durch Phosphorylierung. S6 hat ein Molekulargewicht von 32 kDa und ist an der kleineren, 40S Untereinheit der Ribosomen lokalisiert. Seine Funktion liegt in der Translationsregulation durch Kontrolle der 5'-TOPmRNA (Oligopyrimidin-Abschnitt am 5'-Transkriptionsstartpunkt). Diese mRNAs kodieren primär für ribosomale Proteine und für weitere in der Translationsmaschinerie benötigten Komponenten (Dufner & Thomas, 1999).

Aus der Literatur geht hervor, dass die p70S6K sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist (Pullen & Thomas, 1997). Auch für M-07e Zellen konnte die Kinase in beiden Zellkompartimenten mittels Immunfluoreszenzanalysen lokalisiert werden. Dafür wurde der spezifische anti-phospho-p70S6K Antikörper eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass die phosphorylierte Variante der Kinase nach Cytokin-Stimulation hauptsächlich im Kern zu detektieren war (s. Abb. III. 3.1), während in nicht-stimulierten Zellen phosphorylierte p70S6K hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert war.

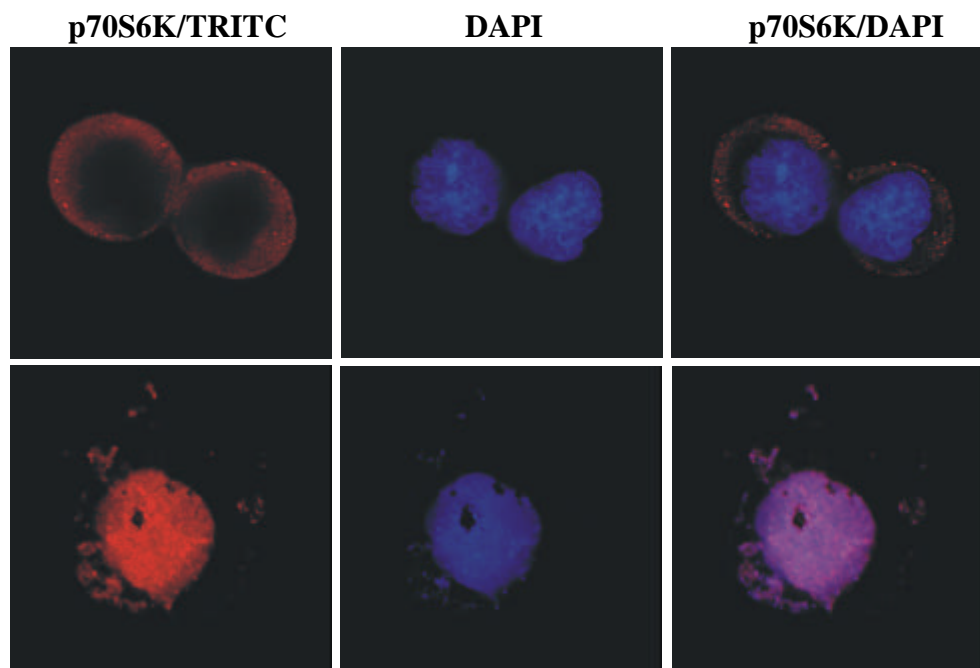


Abb. III. 3.1: Lokalisation endogener p70S6K durch Immunfluoreszenz. Indirekte Immunfluoreszenz-Aufnahmen zur Detektion der pp70S6K in nicht-stimulierten Zellen (oben) und pp70S6K in mit IL-3 (10 ng/ml), für 15 min stimulierten Zellen (unten) mittels gegen diese gerichtetem Antikörper und TRITC markiertem Sekundär-Antikörper in M-07e Zellen.

Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die p70S6K neben der Translationskontrolle auch an der Transkriptionsregulation beteiligt sein soll, führte zu der Hypothese, dass diese Kinase neben S6 noch weitere Interaktionspartner hat und möglicherweise als Aktivator von Transkriptionsfaktoren dient. Durch Screening einer Hela cDNA-Bank sollte daher mit Hilfe des „*Yeast Two-Hybrid*“-Systems ein neuer Ligand der p70S6K identifiziert werden.

3.1 Klonierung der p70S6K und Konstruktion des „*Yeast Two-Hybrid*“ Vektors

Zur Klonierung der p70S6K wurde zunächst die cDNA aus RNA der Zelllinie M-07e mittels reverser Transkription (siehe II. 2.1.15) hergestellt. In einer darauffolgenden PCR-Reaktion (siehe II. 2.1.14) unter Verwendung der neu synthetisierten cDNA als Template wurde die p70S6K mit spezifischen Primern (siehe II. 1.6) amplifiziert und in das pGEM-T Vektor System (siehe II. 1.5) ligiert. Hierzu wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe II. 2.1.3) und das amplifizierte Fragment der korrekten Größe (1578 bp) isoliert. *E.coli*-Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe II. 2.1.13). Die Insert-tragenden Klone wurden mittels der phänotypischen Blau-Weiß-Selektion identifiziert, die Plasmide isoliert (siehe II. 2.1.1.2) und mittels Restriktionsanalysen überprüft. Die als pGEM-T/p70S6K bezeichneten Konstrukte wurden sequenziert (siehe II. 2.1.17). Anschließend wurde die p70S6K cDNA aus dem pGEM-T/p70S6K Konstrukt mit den Enzymen *EcoRI* und *PstI* ausgeschnitten und in den entsprechend hydrolysierten Hefe-Expressionsvektor pGBKT7 (siehe II. 1.5) inseriert. Durch eine Klonanalyse mittels PCR (siehe II. 2.1.14.1) und zusätzlicher Restriktionsanalysen wurde die Klonierung verifiziert. Die Vektorkarten für das „*Yeast Two-Hybrid*“-System sind in der Abbildung III. 3.1.1 dargestellt. Der pACT2 Vektor enthält die cDNA-Genexpressionsbank mit der GAL4 Aktivierungsdomäne, während das pGBKT7/p70S6K Konstrukt die DNA-bindende Domäne exprimiert.

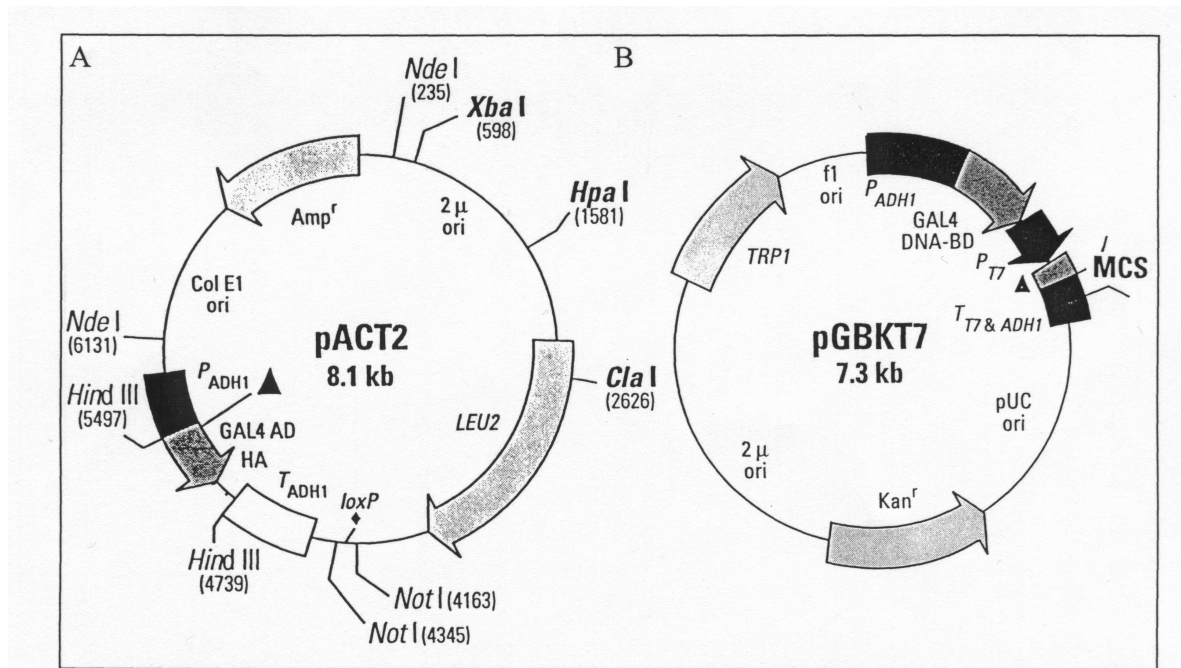


Abb. III. 3.1.1: Schematische Darstellung der Vektoren, die eine Expression der Hela cDNA Bank (pACT2) mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (A) und der GAL4 Bindungsdomäne (pGBKT7/p70S6K) (B) als Fusionsproteine im „Yeast Two-Hybrid“-System ermöglichen.

3.2 „Yeast Two-Hybrid“-Screening einer Hela cDNA Bank

Im „Yeast Two-Hybrid“-System (Fields & Sternglanz, 1984) werden die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit dem DNA-bindenden bzw. dem transkriptionsaktivierenden Modul des GAL4 Transkriptionsfaktors in Hefezellen exprimiert. Das stabil im Hefegenom integrierte β -Galaktosidase-Gen unterliegt dabei der Kontrolle des GAL4 Transkriptionsfaktors. Kommt es zur Interaktion von Proteinen, wird der Transkriptionsfaktor rekonstituiert, was die Expression des Reportergens zur Folge hat. Das gebildete Protein lässt sich durch Blaufärbung im β -Galaktosidase-Filter-Assay nachweisen.

Um einen neuen Interaktionspartner der p70S6K zu identifizieren, wurde diese Kinase in *Saccharomyces cerevisiae* als DNA-Bindungsdomänen-Fusionsprotein exprimiert, während die Hela-cDNA Bank mit dem transkriptionsaktivierenden Modul gekoppelt war. Sowohl die Kinase als auch die cDNA Bank lagen dazu in geeigneten Vektoren vor (siehe Abb. III. 3.1.1). Eine humane Hela cDNA Bank mit 1×10^8 cfu primärer Klone im Plasmid pACT2 (Clontech, siehe Abschnitt II. 1.5) wurde für das Screening

verwendet. Die amplifizierte cDNA Bank hatte einen Titer von 1×10^{11} cfu/ml. Um die Repräsentativität der cDNA Bank zu ermitteln wurde eine Kolonie-Filter-Hybridisierung mit β -Aktin als radioaktiver Sonde durchgeführt (siehe II. 2.1.20.3). Laut Herstellerangaben sollten mind. 0.15% der Kolonien mit β -Aktin hybridisieren, tatsächlich hybridisierten 0.6% der unabhängigen Klone mit der β -Aktin Sonde. Die cDNA Bank wurde daraufhin für das „*Yeast Two-Hybrid*“-Screening eingesetzt. Zunächst wurden die Plasmide isoliert (siehe II. 2.1.1.3) und zusammen mit dem pGBKT7/p70S6K Konstrukt in den Hefestamm AH109 (siehe II. 1.3) transformiert (siehe Abschnitt II. 2.1.18.2). Innerhalb der ersten acht Stunden nach Zugabe des Substrates X-gal (siehe II. 2.1.18.3) wurden acht blaugefärbte Kolonien gezählt. Aus diesen acht positiven Hefe-Klonen wurde die DNA isoliert (siehe II. 2.1.18.4) und in *E.coli* transformiert (siehe II. 2.1.13). Nach erneuter DNA-Präparation wurden die Plasmide sequenziert (siehe II. 2.1.17). Beim Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Datenbank wurde TRAF4 mit der höchsten Sequenz-Übereinstimmung von 99% (Accession-Nr.: X 80200) als neuer Interaktionspartner der p70S6K identifiziert. Bei den anderen 7 Klonen handelte es sich um das ribosomale S10 Protein, das T-Complex-Protein 1, Hippocalcin oder BDR1, Signal recognition particle 19 kDa und 3 weitere nicht identifizierte „open reading frames“. TRAF4 schien für weitere Untersuchungen besonders interessant zu sein, da für andere TRAF Proteine bereits Verbindungen zur TNF-Rezeptor-Familie beschrieben wurden und damit eine Beteiligung an Cytokin-induzierten Signaltransduktionen vorhanden war. Die anderen identifizierten Proteine, die durchaus interessante Verbindungen zur p70S6K darstellen, sollen in weiterführenden Studien näher betrachtet werden. Bisher sind für diese Proteine keine Verbindungen zur p70S6K bekannt.

3.3 Konstruktion eines Expressionsvektors für p70S6K und TRAF4

Um die im „*Yeast Two-Hybrid*“-System gezeigte Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4 zu bestätigen, wurden zunächst eukaryontische Expressionsvektoren hergestellt. Der pcDNA3/Flag-Vektor (freundlicherweise von T. Giesemann, TU-Braunschweig zur Verfügung gestellt) wurde dafür aufgrund seiner hohen Expressionsrate und dem Flag-Tag ausgewählt. Die p70S6K cDNA wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* aus dem

pGEM-T Vektor geschnitten und in den entsprechend hydrolysierten pcDNA3/Flag Vektor ligiert. TRAF4 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* isoliert. Das N-terminal klonierte Flag-Tag konnte später als Transfektionskontrolle mit dem spezifischen anti-Flag M2 Antikörper (siehe II. 1.7) nachgewiesen werden. Die Plasmidkarte des pcDNA3-Vektors ist in der Abbildung III. 3.3.1 dargestellt.

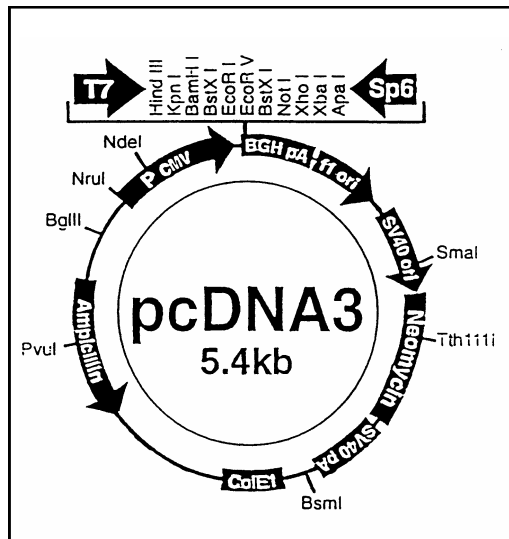


Abb. III. 3.3.1: Plasmidkarte des Vektors pcDNA3/Flag zur Expression von p70S6K und TRAF4 in HEK-293 Zellen. Das Flag-Tag befindet sich zwischen den Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI*. Proteine wurden C-terminal zum Tag kloniert.

3.4 *in vitro* Transkription und Translation von p70S6K und TRAF4

Bevor HEK-293 Zellen mit den Konstrukten pcDNA3/Flag/p70S6K und pcDNA3/Flag/TRAF4 transfiziert wurden, wurde die Expression der Proteine mit Hilfe der *in vitro* Transkription und Translation (siehe Abschnitt II. 2.3.5) überprüft. Die *in vitro* synthetisierten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend autoradiographisch nachgewiesen. Die Abbildung III. 3.4.1 verdeutlicht, dass sowohl die p70S6K als auch TRAF4 in den oben genannten Vektoren mit den korrekten Größen von 70 bzw. 50 kDa translatiert wurden.

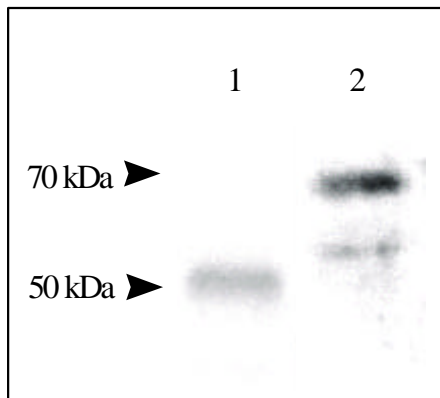


Abb. III. 3.4.1: Autoradiographie der *in vitro* translatierten Proteine TRAF4 und p70S6K

Spur 1: *in vitro* translatiertes rekombinantes 50 kDa TRAF4 (Konstrukt: pcDNA3/Flag/TRAF4). Spur 2: *in vitro* translatierte rekombinante 70 kDa p70S6K mit Abbaubande (Konstrukt: pcDNA3/Flag/p70S6K). Proteine wurden über eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 4 h.

3.5 TRAF4 Immunpräzipitation nach *in situ* Crosslinking

Mittels Coimmunpräzipitation sollte überprüft werden, ob sich die im „Yeast Two-Hybrid“-System erstmals gezeigte Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4 auch in humanen Zellen bestätigen läßt. Zunächst wurden HEK-293 Zellen, die kein endogenes TRAF4 exprimieren, mit den in Kapitel III. 3.3 beschriebenen p70S6K und TRAF4 Konstrukten transfiziert. Stabil exprimierende Zellklone konnten mittels Puromycin-haltigem Medium selektioniert, mit Hilfe von Klonierungszyklindern vereinzelt und weiter kultiviert werden. Die Proteine lagen dabei als Fusionsprotein mit dem Flag-Tag vor, welches selektiv durch den anti-Flag M2 Antikörper (s. II. 1.7) erkannt wird. Zusätzlich wurde die p70S6K in einem Konstrukt ohne Flag-Tag transfiziert, um die Spezifität des anti-Flag M2 Antikörpers zu überprüfen.

Um die Protein-Komplexe noch in der lebenden Zelle, also *in situ*, zu stabilisieren, wurden sie vor der Lyse der Zellen mit dem membrangängigen Crosslinker DSP behandelt (Hüttelmaier et al., 1998; Weiss et al., 1998). Die erhaltenen Fraktionen wurden mit dem spezifischen anti-TRAF4 Antikörper (siehe II. 1.7) inkubiert und anschließend mit Protein G-Sepharose, welche Immunglobuline der Klasse G spezifisch bindet, präzipitiert. Danach wurden die sedimentierten und gewaschenen Protein-Präzipitate nach SDS-Denaturierung gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elektrophoretoblot auf Nitrocellulose übertragen. Die Membran wurde dann mit dem anti-p70S6K Antikörper (s. II. 1.7) zum Nachweis der an TRAF4 gebundenen p70S6K inkubiert (Abb. III. 3.5.1 A).

Wie aus der Abbildung III. 3.5.1 (A+B) ersichtlich ist, copräzipitieren TRAF4 und p70S6K, die Interaktion beider Proteine wird durch diesen Versuch im humanen System bestätigt. Die Abbildung III. 3.5.1 (B: Spur 1) stellt die Transfektionskontrolle dar. In der Spur 2 wurde die p70S6K in einem separaten Konstrukt ohne Flag-Tag mitgeführt. TRAF4 dagegen wurde mit dem Flag-Tag als Fusionsprotein exprimiert. Dies bestätigt die Spezifität des anti-Flag M2 Antikörpers. Zur Überprüfung des Crosslinkers wurden transfizierte Zellen ohne DSP-Behandlung mitgeführt, die p70S6K ließ sich, wie erwartet, in diesen Ansätzen nicht über TRAF4 präzipitieren. Die Immunoblots bestätigen die erstmals im „*Yeast Two-Hybrid*“-System entdeckte Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4.

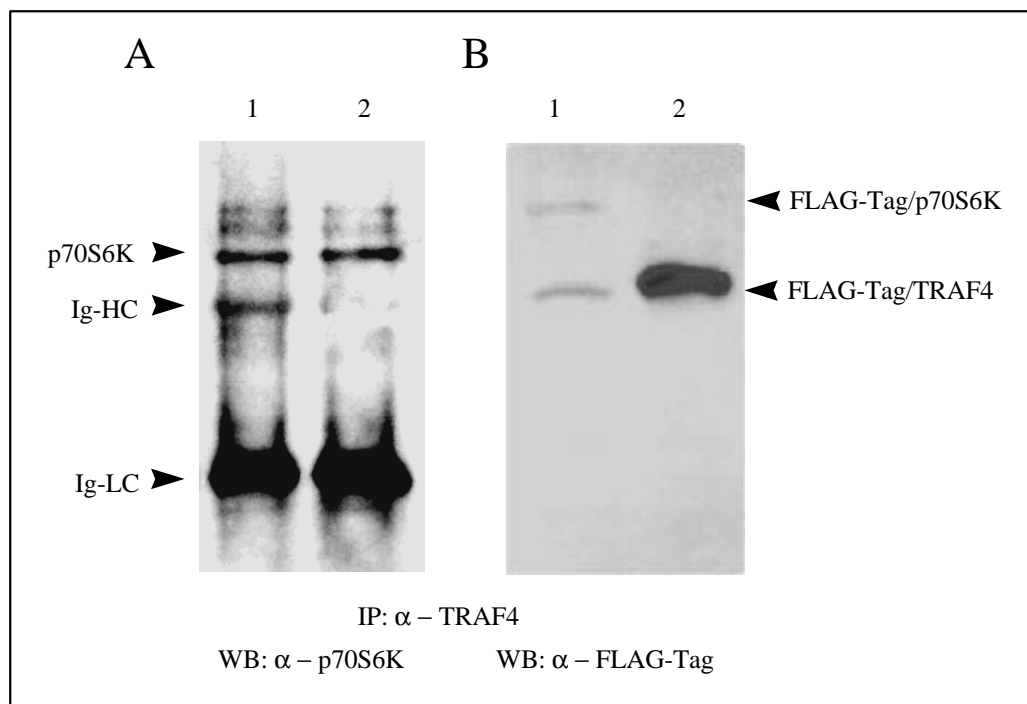


Abb. III. 3.5.1: Coimmunpräzipitation von transfizierter p70S6K durch TRAF4 aus HEK-293 Zell-Lysaten. HEK-293 Zellen wurden mit den Konstrukten (1) *pcDNA3/Flag/p70S6K* und *pcDNA3/Flag/TRAF4* und (2) *pcDNA3/p70S6K* und *pcDNA3/Flag/TRAF4* stabil cotransfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit dem membranpermeablen Crosslinker DSP behandelt. (A) Die Proteinkomplexe wurden mit dem anti-TRAF4 Antikörper präzipitiert. Nach SDS-PAGE erfolgte der Nachweis der an TRAF4 gebundenen p70S6K über einen spezifischen Antikörper. Als Transfektionskontrolle (B) erfolgte die Detektion mittels spezifischem anti-Flag M2 Antikörper. Ig-HC: Schwere-Antikörper-Kette („heavy-chain“); Ig-LC: Leichte-Antikörper-Kette („light-chain“).

Nachdem in HEK-293 Zellen der Nachweis gelungen war, dass ektopisch exprimierte TRAF4 und p70S6K Proteine interagieren, sollte überprüft werden, ob das auch auf Zelllinien zutrifft, die diese Proteine endogen exprimieren. Dazu wurden endogene Proteine nicht transfizierter Hela und TF-1 Zellen mit DSP gecrosslinked und immunpräzipitiert. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4 (siehe Abb. III. 3.5.2). Um Rückschlüsse auf die Lokalisation dieser Proteine ziehen zu können, wurden Cytoplasma- und Kernfraktion getrennt immunpräzipitiert. Bei Hela Zellen wurde die an TRAF4 gebundene p70S6K hauptsächlich in der Kernfraktion nachgewiesen, bei TF-1 Zellen ließ sich diese Verbindung in beiden Fraktionen präzipitieren. Die Abbildung III. 3.5.2 zeigt die Western Blots zu diesen Experimenten.

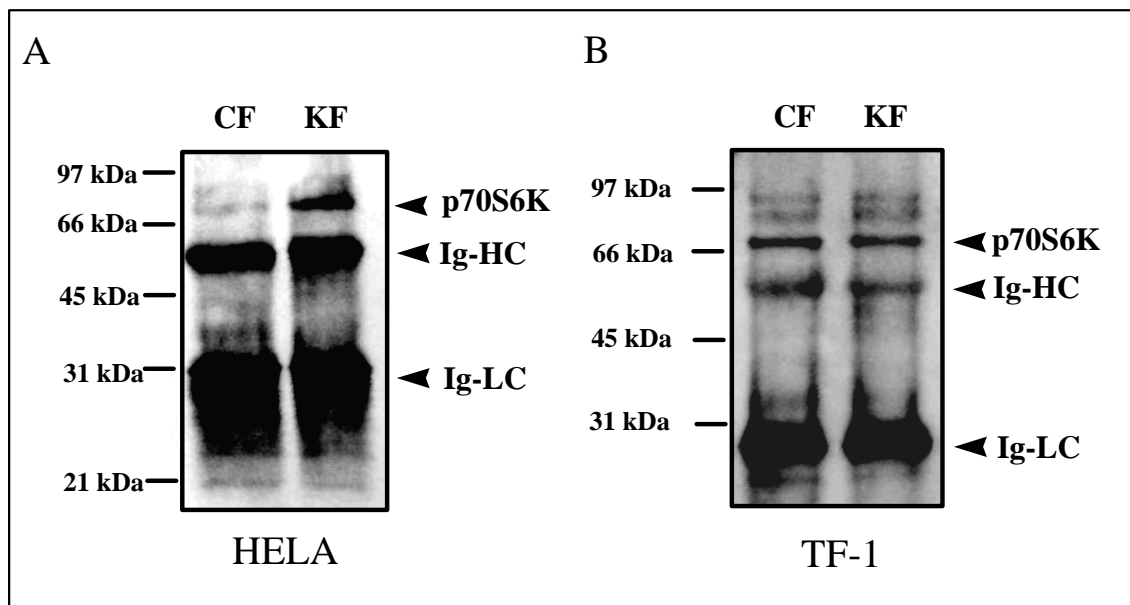


Abb. III. 3.5.2: Coimmunpräzipitation von endogener p70S6K und TRAF4 aus Zell-Lysaten von Hela und TF-1. Die Zellen wurden vor der Lyse mit dem membranpermeablen Crosslinker DSP behandelt. Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe des anti-TRAF4 Antikörpers präzipitiert. Nach SDS-PAGE erfolgte der Nachweis der an TRAF4 gebundenen p70S6K über einen spezifischen Antikörper. Ig-HC: Schwere-Antikörper-Kette („heavy-chain“); Ig-LC: Leichte-Antikörper-Kette („light-chain“); CF: cytosolische Fraktion; KF: Kernfraktion.

3.6 Expression von TRAF4 in Zellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs

Da die TRAF4 Expression spezifisch mit Mammakarzinomen in Zusammenhang gebracht wurde (Regnier et al., 1995; Tomasetto et al., 1995), sollte überprüft werden, ob es gewebespezifische Expressionsmuster dieses Gens gibt.

In dieser Arbeit wurden 61 humane Zelllinien aus verschiedenen Geweben durch RT-PCR spezifisch auf TRAF4 Genexpression untersucht. Die so gewonnenen Daten sind in der Abbildung III. 3.6.1, die eine begrenzte Auswahl der untersuchten Zelllinien darstellt und in den Tabellen III. 3.6.1 und III. 3.6.2 zusammengefaßt.

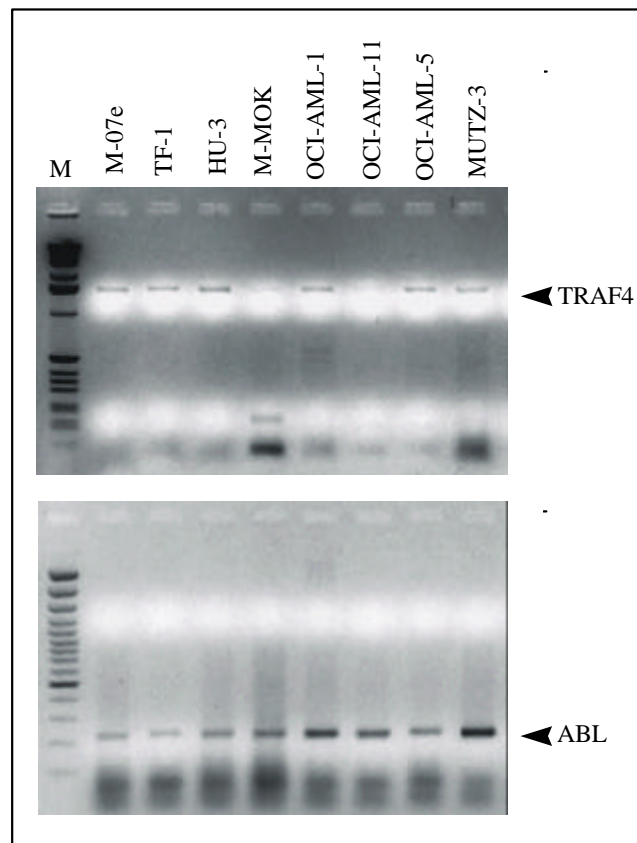


Abb. III. 3.6.1: Nachweis von TRAF4 durch RT-PCR.

Dargestellt ist die Auftrennung der TRAF4 und ABL PCR-Produkte. Die PCR erfolgte mit cDNA verschiedener Zelllinien. Oben: TRAF4 wurde mit den spezifischen Primern F-TRAF4EcoRI/R-TRAF4XhoI amplifiziert. Unten: ABL PCR wurde durchgeführt, um die Qualität der cDNA zu prüfen. ABL wird ubiquitär exprimiert. Für die PCR Reaktion wurden die spezifischen Primer ABL-F und ABL-R eingesetzt. M = Marker.

Zelltyp	Zelllinie	TRAF4	Zelltyp	Zelllinie	TRAF4
Blasen-Karzinom	639-V	+	Mamma-Karzinom	BT-474	+
	647-V	+		DU-4475	+
	HT-1376	+		EFM-192 C	+
	SW-1710	+		KPL-1	+
	T-24	-		MCF-7	+
	TCC-SUP	-		MT-3	+
Colon-Karzinom	CACO-2	+	Lungen-Karzinom	A-459	+
	COLO-206F	+		COLO-699	+
	HCT-15	+		CPC-N	+
	HT-29	-		EPLC-272H	+
	LOVO	+		LCLC-103H	+
	SW-403	+		SAOS-2	+
Nieren-Karzinom	293	-	Pankreas-Karzinom	CAPAN-1	+
	A-498	+		CAPAN-2	-
	BFTC-909	-		PA-TU8988S	-
	CACI-2	-		PA-TU8988T	+
Gliom	42-MF-BA	+	Neuroblastom	CHP-126	+
	DK-MG	+		KELLY	+
	LN-405	+		SIMA	+
	SNB-19	+			

Tab. III. 3.6.1: Genexpression von TRAF4 in Zelllinien verschiedener Gewebe.
 In den Tabellen sind die TRAF4 RT-PCR Ergebnisse zusammengefaßt dargestellt.

Zelltyp	Zelllinie	TRAF4	Zelltyp	Zelllinie	TRAF4
AML-Zellen	M-07e	+	T-Zell-Leukämie	CCRF-CEM	-
	TF-1	+		LOUCY	-
	HU-3	+		P12-Ichikawa	-
	M-MOK	-/+		MOLT-3	+
	OCI-AML-1	+		MOLT-16	+
	OCI-AML-5	+		JURKAT	+
	OCI-AML-11	-/+	B-Zell-Leukämie	697	+
	MUTZ-3	+		BV-173	+
Multiples-Myelom (B-Zell-Leukämie)	OPM-2	+		MHH-CALL2	+
	LP-1	+		MHH-CALL3	+
	RPMI-8226	-		NALM-6	+

Tab. III. 3.6.2: Genexpression von TRAF4 in verschiedenen hämatopoietischen Zelltypen.

Aus den Tabellen geht hervor, dass fast alle untersuchten Zelllinien, sowohl die des hämatopoietischen Systems als auch die der einzelnen Gewebe TRAF4 exprimieren. Insgesamt wurden 39 Zelllinien aus den jeweiligen Geweben untersucht (siehe Tab. III. 3.6.1), der prozentuale Anteil der TRAF4-Expriemierer liegt bei 80% (31/39). Alle getesteten Brustkarzinomlinien 100% (6/6), Lungenkarzinomlinien 100% (6/6), Glioma-100% (4/4) und Neuroblastomlinien 100% (3/3) exprimieren TRAF4 mRNA.

Von den Zelllinien der myeloiden als auch der lymphoiden Reihe sind 82% (18/22) TRAF4 positiv, zwei davon (M-MOK und OCI-AML-11) sind schwach positiv (siehe Abb. III. 3.6.1). Bei M-MOK wurde zusätzlich eine unspezifische Bande amplifiziert. Innerhalb der T-Zellreihe sind 50% (3/6) TRAF4-Expriemierer, während 88% der B-Zellreihe (7/8) TRAF4 mRNA transkribierten.

Mittels Northern Blot mit spezifischer TRAF4-Sonde sollten die PCR-Daten verifiziert werden. Aufgrund zu geringer mRNA Mengen, war eine Auswertung in den meisten Fällen mit dieser Methode nicht möglich. Die gewebespezifischen Untersuchungen mußten deshalb auf die PCR-Ergebnisse beschränkt bleiben.

3.7 Lokalisationsstudien von p70S6K/TRAF4 in HEK-293 Zellen

Diese Methode wurde zur Antikörper unabhängigen Untersuchung der Lokalisation von TRAF4 und p70S6K angewendet. Die cDNA dieser Proteine lag hierfür als Fusionsprotein mit EGFP (Green fluorescent protein, variant E) bzw. DsRFP (Red fluorescent protein) vor. Der jeweils leere Vektor sollte dabei als Kontrolle dienen. Die Fusionsproteine wurden nach stabiler Transfektion von HEK-293 Zellen exprimiert.

Geplant wurden diese Versuche, um eine mögliche Colokalisation dieser Proteine nach Stimulation mit Cytokinen im Kern zu finden. Probleme gab es jedoch schon beim Aufwachsen der doppelt transfizierten Zellen auf Objektträger. Auch auf gelatinisierten bzw. kollagenisierten Objektträgern blieb das Anwachsen erfolglos. Nicht transfizierte Zellen dagegen wuchsen problemlos auf gelatinisierten Objektträgern an. Adhäsionsschwierigkeiten der transfizierten Zellen wurden auch beim Transfer auf neue Kulturgefäße beobachtet. Die Zellen adhärirten stark verzögert, verglichen mit den nicht-transfizierten HEK-293 Zellen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Zellen bereits in Kulturflaschen mit und ohne IL-3 (10 ng/ml) für 15 min inkubiert und durch vorsichtiges abspülen gelöst. Nach Auftropfen der Zellen auf Objektträger konnten die grün bzw. rot fluoreszierenden Fusionsproteine mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Da die Zellen nicht aufgewachsen waren, lagen sie in abgerundeter Form vor, was für die Lokalisationsstudien nachteilig war. Es machte keine Unterschiede, ob die Zellen mit IL-3 behandelt waren oder nicht, die Proteine wurden diffus exprimiert und konnten keinem Kompartiment eindeutig zugeordnet werden. Bei starker Überexpression von TRAF4/EGFP traten röhrenförmige Gebilde auf, in denen das Protein eingeschlossen war. Es könnte sich dabei um sogenannte „inclusion-bodies“ handeln, in denen das in dieser hohen Konzentration für die Zellen evtl. toxischen Proteins eingeschlossen war. Die Technik dieser Methode muß in weiterführenden Versuchen noch verbessert werden, um konkrete Aussagen treffen zu können.

4 Funktionsanalyse der p70S6K/TRAF4 Interaktion in HEK-293 Zellen

4.1 TNF- α aktiviert die p70S6K in TRAF4-positiven, nicht aber in TRAF4-negativen Zellen

Nachdem die im „*Yeast Two-Hybrid*“-System entdeckte Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4 durch Coimmunpräzipitationsexperimente in humanen Systemen mehrfach bestätigt worden war, sollte die Funktion dieser Verbindung näher charakterisiert werden. TRAF4 gehört zur Familie der TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren, von denen bisher sechs identifiziert sind. Mitglieder dieser Familie sind sowohl an der Regulation apoptotischer Signaltransduktionswege beteiligt als auch an der Expression proliferativ wirkender Gene (Arch et al., 1998). Über die Funktion von TRAF4 selbst ist bisher wenig bekannt. Aus Literaturdaten geht jedoch hervor, dass TRAF4 an der cytoplasmatischen Domäne des Lymphotoxin- β -Rezeptors (LT β R), eines Mitgliedes der TNF-Rezeptorfamilie, bindet (Arch et al., 1998; Krajewska et al., 1998). Um erste Hinweise auf eine mögliche Funktion von TRAF4 zu erhalten, wurden daher Cytokin-„gehungerte“ TF-1 Zellen mit LT $\alpha_2\beta_1$ stimuliert.

Nach Crosslinking mit DSP wurde TRAF4 immunpräzipitiert. In Immunoblots wurde ausschließlich die an TRAF4 gebundene p70S6K detektiert. Dabei stellte sich heraus, dass durch Stimulation mit LT $\alpha_2\beta_1$ die Interaktion zwischen TRAF4 und p70S6K induziert wurde (siehe Abb. III. 4.1.1). Desweiteren zeigte sich, dass die mit LT $\alpha_2\beta_1$ stimulierten Zellen proliferierten (SI nach 48 h: 4.5) und die durch Cytokinentzug induzierte Apoptose verhindert wurde.

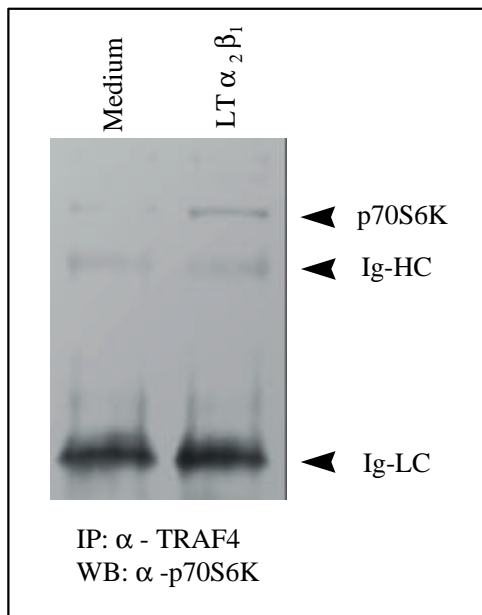


Abb. III. 4.1.1: Coimmunpräzipitation endogener p70S6K durch TRAF4. *TF-1 Zellen wurden 18 h in RPMI 1640-Medium mit 0,1% BSA inkubiert, anschließend für 15 min mit LT $\alpha_2\beta_1$ (500 ng/ml) behandelt. Vor der Lyse wurden die Zellen mit dem membran-permeablen Crosslinker DSP behandelt. Die Proteinkomplexe wurden mit dem anti-TRAF4 Antikörper präzipitiert. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion der p70S6K über einen gegen diese Kinase gerichteten Antikörper. Ig-HC: Schwere-Antikörper-Kette („heavy-chain“); Ig-LC: Leichte-Antikörper-Kette („light-chain“).*

Als weitere Arbeitshypothese stand die Vermutung, dass TRAF4 auch eine Funktion bei TNF induzierten Signaltransduktionsvorgängen haben könnte, da für andere TRAF Mitglieder Verbindungen zum TNF-Rezeptor II beschrieben sind (Rothe et al., 1994).

HEK-293 Zellen, die kein endogenes TRAF4 exprimieren, wurden für diese Versuche stabil mit TRAF4 und p70S6K Expressionsplasmiden transfiziert. Trotz endogener Expression der p70S6K, wurde das Expressionsplasmid zusätzlich transfiziert, um quantitativ vergleichbare Protein-Mengen in den Zellen zu haben. Anschließend wurde überprüft, ob diese Zellen den TNF-Rezeptor exprimieren und damit TNF induzierbar sind. Dies sollte experimentell in NF- κ B Gel-Shift Experimenten („electrophoretic mobility shift assay“, EMSA) nachgewiesen werden (s. Abb. III. 4.1.2), da viele Zellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B als Reaktion auf die Bindung von TNF- α aktivieren (Quentmeier et al., 2000).

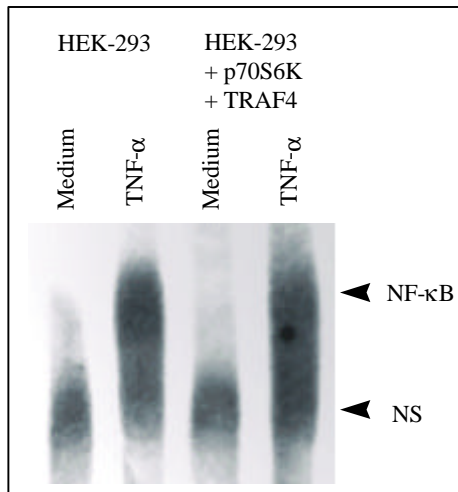


Abb. III. 4.1.2: Effekte der TNF- α Stimulation auf die NF- κ B Aktivierung. TNF- α induziert die NF- κ B Aktivierung in HEK-293 und mit TRAF4 und p70S6K transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden für 30 min mit TNF- α (20 ng/ml) stimuliert. Die daraus gewonnenen Kernextrakte wurden mit der digoxigeninmarkierten NF- κ B Sonde inkubiert. Zur Detektion der NF- κ B Aktivierung wurden EMSAs durchgeführt. NS = unspezifisch DNA-bindende Bande.

Dass HEK-293 Zellen tatsächlich durch TNF- α induzierbar sind, geht aus der Abbildung III. 4.1.2 hervor. Sowohl nicht transfizierte HEK-293 Zellen als auch die mit den Konstrukten pcDNA3/Flag/TRAF4 und pcDNA3/Flag/p70S6K transfizierten Zellen aktivieren nach TNF- α Stimulation NF- κ B. Folglich exprimieren sie den TNF-Rezeptor. Da diese Grundvoraussetzung erfüllt war, sollte untersucht werden, ob die Stimulation des TNF-R in den Zellen, die TRAF4 exprimieren, und nur in diesen Zellen zur Aktivierung der p70S6K führt.

Als Maß für die Aktivität der p70S6K wurde die Menge des phosphorylierten Substrates (S6) im Immunoblot gewertet (siehe Abbildung III. 4.1.3). TNF- α Stimulation führte nur in den Zellen zur Phosphorylierung von S6, in denen TRAF4 exprimiert wurde (s. Abb. III. 4.1.3 A, Spur 2). HEK-293 Zellen exprimieren die p70S6K im Gegensatz zu TRAF4 auch endogen. Daher findet sich eine niedrige Grundstimulation von S6 auch in nicht-transfizierten HEK-293 Zellen (siehe Abbildung III. 4.1.3 B oben). Eine Stimulation der p70S6K Aktivität durch TNF- α läßt sich jedoch nur in den Zellen beobachten, die neben der p70S6K auch TRAF4 exprimieren. Dabei spielte es keine Rolle, ob endogene p70S6K oder transfizierte p70S6K in den Zellen exprimiert wurden. Zusätzlich wurden HEK-293 Zellen mit TNF- α stimuliert, die vorher nur mit dem TRAF4 Expressionsplasmid transfiziert wurden, also die p70S6K endogen exprimierten. Auch in diesen Zellen wurde eine erhöhte S6 Phosphorylierung detektiert. HEK-293 Zellen dagegen, die ausschließlich mit dem p70S6K, nicht jedoch mit dem TRAF4 Expressionsplasmid transfiziert wurden, zeigten nach TNF- α Stimulation keinen Phosphorylierungsanstieg von S6, genau wie es auch bei nicht transfizierten

Zellen zu beobachten war. D.h. TNF- α Stimulation führte nur in den Klonen zur Aktivierung der p70S6K, in denen neben der p70S6K auch TRAF4 exprimiert wurde. Durch die Hemmstoffe Rapamycin und Wortmannin konnte die p70S6K inhibiert werden. Wortmannin blockiert den PI-3K/p70S6K Signaltransduktionsweg bereits durch Inhibition der PI-3K (zur Übersicht siehe Schema der Abb. I. 3). Bei gehemmter p70S6K (s. Abbildung III. 4.1.3 Spuren 3+4) wurde S6 nach TNF- α Stimulation nicht phosphoryliert.

Dass HEK-293 Zellen den IL-1 Rezeptor exprimieren wurde bereits von Guo und Mitarbeitern beschrieben (2000). Die Stimulation der Zellen mit dem proliferationsfördernden Cytokin IL-1 sollte als Kontrolle dienen, um auszuschließen, dass die Phosphorylierung von S6 nicht durch Cytokine allgemein ausgelöst wurde. In diesen Ansätzen wurde kein Phosphorylierungsanstieg beobachtet, verglichen mit der Mediumkontrolle (siehe Abbildung III. 4.1.3 Spuren 7-9). Diese Daten zeigen, dass die p70S6K über die Verbindung zu TRAF4 eine Funktion bei TNF-induzierten Signaltransduktionen hat.

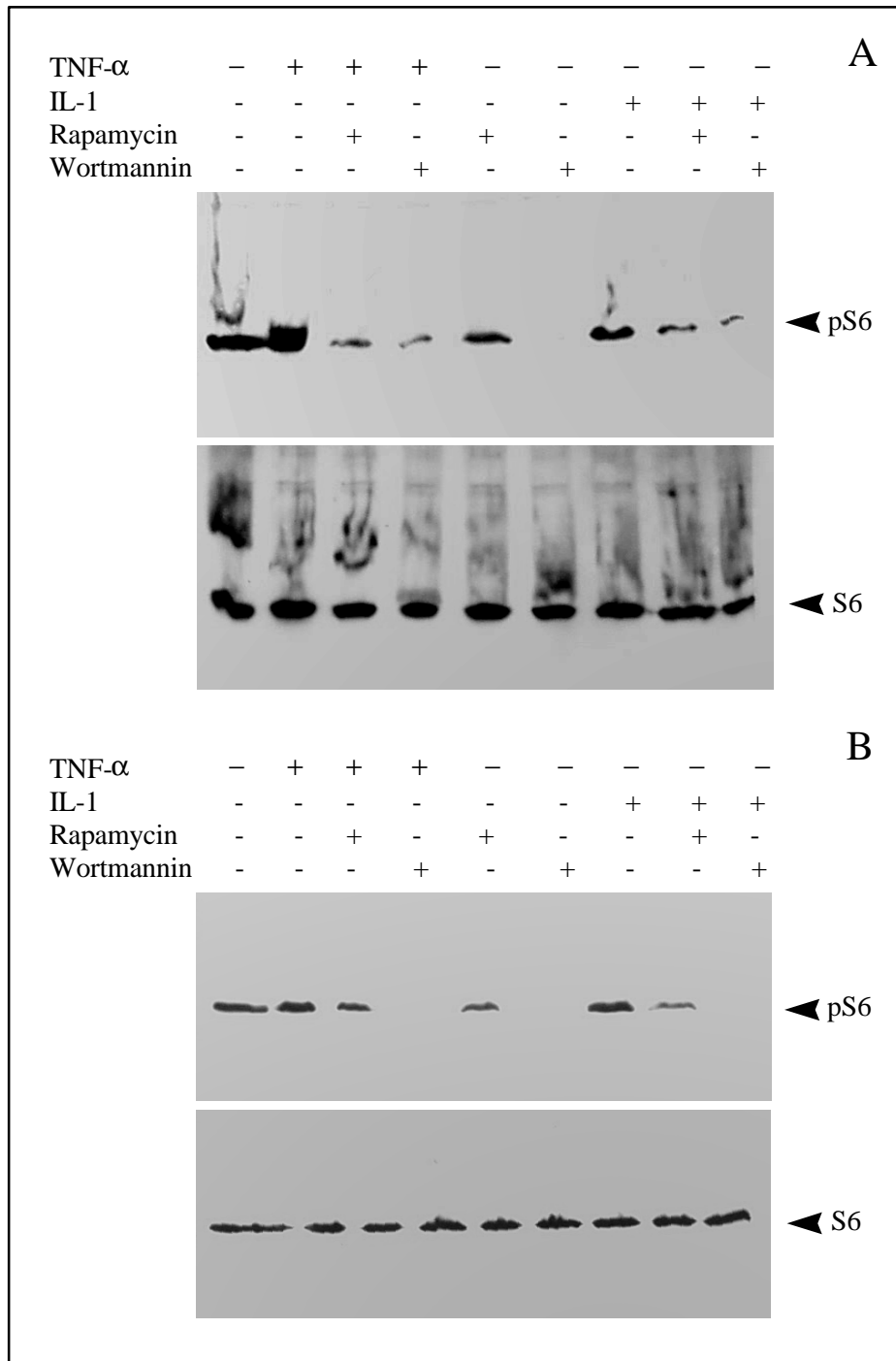


Abb. III. 4.1.3: Immunoblot zur Detektion der S6 Phosphorylierung nach Stimulation mit TNF- α und IL-1. A) HEK-293 Zellen wurden stabil mit den Konstrukten pcDNA3/Flag/TRAF4 und pcDNA3/Flag/p70S6K transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit TNF- α (10 ng/ml) bzw. mit IL-1 (10 ng/ml) für 15 min. Mit den Hemmstoffen Rapamycin (10 ng/ml) bzw. Wortmannin (100 nM) wurden die Zellen für 1 h präinkubiert. B) Kontrolle: nicht transfizierte HEK-293 Zellen. A+B: Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteinextrakte per SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Mittels spezifischer Antikörper konnte phosphoryliertes S6 Protein von nicht phosphoryliertem unterschieden werden. TNF- α induziert S6 Phosphorylierung in TRAF4 exprimierenden Zellen.

IV DISKUSSION

Obwohl die Ras/Raf/MAPK-, PI-3K/p70S6K- und JAK/STAT-Signaltransduktionswege bereits ausgiebig charakterisiert sind, ist bisher wenig darüber bekannt, welcher dieser Wege die Proliferation hämatopoietischer Zellen am meisten beeinflusst. Auch über das Tumorsuppressorprotein p53 werden Signale vermittelt, die regulativ in Wachstums- und Apoptoseprozesse eingreifen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Cytokin-abhängige mit -unabhängigen Zelllinien bezüglich ihres p53 Statusses verglichen. Desweiteren konnte der p70S6K eine zentrale Rolle in der Proliferation aber auch bei anti-apoptotischen Prozessen myeloischer Zellen zugeordnet werden. Mit Hilfe des „*Yeast Two-Hybrid*“-Systems wurde TRAF4 als neuer Partner der p70S6K identifiziert. Dieser Verbindung konnte anschließend eine Beteiligung an TNF vermittelten Signaltransduktionen zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden unter Berücksichtigung anderer Forschungsarbeiten diskutiert.

1 p53 als Mediator Cytokin-unabhängiger Proliferation?

Veränderungen des p53 Tumorsuppressor-Gens stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung humaner Tumore (Aas et al., 1996). Besonders Mutationen, die in der „Hot Spot“ Region von p53, in den Exon Bereichen 5-9 liegen, werden mit der Onkogenese in Verbindung gebracht (Walker et al., 1999). Dieser Genabschnitt wird daher genauer untersucht, um darüber evtl. Ansätze für die Krebstherapie zu erhalten (Neri et al., 1993; Milner 1995; Aas et al., 1996). Besonders geeignet dafür ist eine Kombination aus SSCP-Analyse, für eine schnelle Auswertung mit anschließender Sequenzierung, die durchgeführt wird, um die Veränderungen genau zu lokalisieren.

Um die Rolle von p53 als Mediator Cytokin-unabhängiger Proliferation zu untersuchen, wurden während dieser Arbeit 19 AML-Zelllinien auf die Häufigkeit und Art der Mutation des p53 Gens durch SSCP und Sequenzierung analysiert. Die beiden Linien HL-60 und KG-1 sind die einzigen im Rahmen dieser Untersuchungen, die kein p53 Protein exprimieren. Ritchie und Mitarbeiter (1997) zeigten, dass das wt p53 Protein Wachstumsfaktor-abhängiger Linien hauptsächlich detektierbar war, wenn die Zellen

über einen gewissen Zeitraum ohne Wachstumsfaktoren im Medium gehalten wurden. Wurden die Zellen in Cytokin-haltigem Medium gehalten, so war ausschließlich die mutierte Variante von p53 detektierbar. Demnach kann das p53 Protein seine Konformation von der wachstumshemmenden „Suppressor-Form“ (wt) zu der sogenannten „Promoter-Form“ (mut) wechseln (Zhu et al., 1994). Ritchie und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass diese Konformationsänderung von der „Suppressor“- zur „Promoter“-Form bei M-07e Zellen nach Stimulation mit Thrombopoietin auftrat. Das in der „Promoter“-Konformation vorliegende p53 Protein korreliert aber offensichtlich mit dem Zellwachstum. Dieser These nach hat wt p53 eine zentrale Funktion als Mediator der Cytokin-induzierten Proliferation. Demnach müssten theoretisch alle Wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinien das wt p53 Protein, also die „Suppressor“-Form exprimieren können, dürften also keine Mutationen im p53 Gen aufweisen, während unabhängige Linien durchaus Veränderungen im p53 Gen haben könnten. Durch diese Mutationen wären unabhängige Linien folglich nicht mehr in der Lage, die p53 Konformation auf Proteinebene zu ändern.

Für die SSCP-Analysen stand die Hypothese, dass nach Inaktivierung von p53 AML-Zelllinien in die Lage versetzt werden, Wachstumsfaktor-unabhängig zu proliferieren. Dazu wurde der p53 Status Wachstumsfaktor-abhängiger und -unabhängiger Zelllinien miteinander verglichen. Aus diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass p53 Gen-Mutationen nicht explizit in Cytokin-unabhängigen Linien zu beobachten waren, sondern auch in Cytokin-abhängigen Linien aufgetreten sind. (6/11) der Cytokin-unabhängigen sowie (4/8) der Cytokin-abhängigen Linien hatten Mutationen. Diese Ergebnisse widerlegen die Hypothese, dass p53 Inaktivierung ein obligatorischer Schritt in Richtung Cytokin-Unabhängigkeit für AML-Zelllinien darstellt. Insgesamt tragen 10 der 19 in Betracht gezogenen AML-Zelllinien Mutationen im p53 Gen. 5 davon waren bereits aus der Literatur bekannt, 5 weitere Veränderungen konnten im Rahmen dieser Arbeit als neue Mutationen beschrieben werden. Die restlichen 9 Zelllinien haben keine p53 Mutation im untersuchten Genabschnitt, für die Zelllinie M-07e war dies schon bekannt (Ritchie et al., 1999).

Während dieser Arbeit wurden neue p53 Mutationen für 5 bisher nicht untersuchte AML-Linien (F-36P, MEG-01, M-MOK, MV4-11 und NB-4) detektiert. Zusätzlich konnte mittels SSCP und Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass das p53 Gen von TF-1 Zellen verändert ist, was zur Expression eines kleineren Proteins führt. Ein

anschließender Vergleich der wt cDNA Sequenz von p53 mit der von Sugimoto und Mitarbeiter (1992) beschriebenen Thymidin-Deletion könnte die Erklärung für die kleinere p53 Variante in TF-1 Zellen sein. Diese Deletion läßt ein Stop Codon am Codon 342 entstehen, was zu einem Verlust von 50 Aminosäuren führt.

2 Die PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion hat eine zentrale Funktion bei der Proliferation myeloischer Zellen

Im Gegensatz zu anderen ausdifferenzierten Zellen, wie Nerven- oder Muskelzellen, hat die Mehrzahl der hämatopoietischen Zellen eine begrenzte Lebensdauer und wird daher kontinuierlich nachgebildet. Aufgrund dieses ständigen Erneuerungsprozesses unterliegen Blutzellen einer intensiven Kontrolle, was Wachstums- oder Differenzierungsprozesse betrifft. Die Regulation wird hauptsächlich durch Cytokine, die in vielen Fällen von Leukocyten produziert werden, beeinflusst. In dieser Arbeit wurden Cytokine verwendet, die an Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie binden (GM-CSF, IL-3) sowie solche, die Rezeptortyrosinkinasen aktivieren (FLT-3L, M-CSF, SCF).

Die MAPK (p42/p44)-Signaltransduktion wird nach Cytokin-Bindung an Rezeptoren beider oben genannter Rezeptor-Familien aktiviert (Schaeffer & Weber, 1999). Über das kleine G-Protein Ras und der MAPKKK Raf erfolgt schließlich die Aktivierung der MAPKK (MEK1,2), die wiederum die „downstream“ liegende MAPK (ERK-1,2) an Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert. Erst die Phosphorylierung an beiden Aminosäuren bewirkt die Aktivierung der MAPK, die anschließend in den Kern transloziert und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Myc oder Elk-1 phosphoryliert (Rincon et al., 2001). Elk-1 ist einer dieser Transkriptionsfaktoren, die zusammen mit einem weiteren DNA-Bindeprotein („serum response factor“, SRF) an eine kurze DNA-Sequenz, dem SRE („serum response element“) binden und damit die Genexpression regulieren (Johansen & Prywes, 1995).

Die PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion wird ebenfalls über Cytokine beider oben erwähnter Rezeptor-Familien aktiviert. Nach Aktivierung der PI-3K durch Tyrosinphosphorylierung oder direkte Bindung von Ras-GTP wird die Polyphosphoinositid-Synthese angeregt. Über ihre Phosphoinositid-bindende PH-

Domäne wird die an die Plasmamembran rekrutierte Kinase PDK-1 aktiviert, die daraufhin die p70S6K und Akt/PKB phosphoryliert. Akt/PKB phosphoryliert FRAP/mTOR, das ebenfalls eine Phosphorylierung der p70S6K bewirkt. Die aktivierte p70S6K ist hauptsächlich an der Translationsregulation über die Phosphorylierung von S6 beteiligt, darüberhinaus soll diese Kinase indirekt über die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F eine Funktion in der Genexpression haben (Leibiger et al., 1998; Brennan et al., 1999).

Aus der Literatur geht hervor, dass AML-Zellen proliferieren, wenn sie durch Cytokine, die Rezeptortyrosinkinasen und Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie aktivieren, stimuliert werden (Drexler et al., 1997). Diese Arbeiten geben jedoch keine Hinweise darauf, welche Signaltransduktionswege an der Proliferationsinduktion beteiligt sind, was in dieser Arbeit geklärt werden konnte. Desweiteren stellten Drexler und Mitarbeiter (1997) fest, dass Zellen schwächer proliferierten, wenn sie durch Cytokine stimuliert wurden, die Rezeptortyrosinkinasen aktivieren als durch solche, die Cytokinrezeptoren aktivieren.

Bei vergleichenden Analysen der jeweiligen Signaltransduktionswege mit Hilfe von Proliferationsassays stellte sich heraus, dass der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg eine maßgebliche Funktion bei der Proliferation hat. Dabei kamen die als spezifisch erachteten Inhibitoren PD98059 und Rapamycin zum Einsatz, um die Ras/Raf/MAPK- und PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionswege von M-07e, MUTZ-3, OCI-AML-5 und TF-1 Zellen zu unterbrechen. Stimuliert wurden die Zellen mit Cytokinen beider Familien, um zu prüfen, ob je nach Rezeptorklasse unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert werden, die schließlich zur Proliferation führen. OCI-AML-5 und MUTZ-3 zeigten nach Rezeptortyrosinkinaseaktivierung eine um etwa die Hälfte schwächere Proliferationsrate, verglichen mit den Ansätzen, in denen die Cytokinrezeptoren aktiviert wurden. Für die Zelllinien M-07e und TF-1 stellte sich heraus, dass die Proliferationszunahme nach Stimulation beider Rezeptorklassen in etwa gleich ist. Cytokin-induzierte Proliferation ist demnach auch von den jeweiligen Zelllinien abhängig.

Nach Stimulation der Zellen mit IL-3 wurde unter Einsatz des Inhibitors Rapamycin und damit inhibierter p70S6K meist eine Wachstumshemmung um etwa die Hälfte beobachtet. Bei einer Zelllinie sogar um mehr als 75%. Bei inaktiver MAPK, unter Verwendung von PD98059, wurde die Proliferation für zwei Zelllinien um etwa ein

Drittel reduziert, bei zwei weiteren Zelllinien sogar um mehr als die Hälfte. Nach Stimulation mit SCF (Rezeptortyrosinkinase-Aktivator) und Inhibition der p70S6K reagierten drei Zelllinien mit einer Proliferationsreduktion von mehr als 70%, bei gehemmter MAPK um etwa die Hälfte. Interessanterweise verhielten sich OCI-AML-5 Zellen anders als die anderen drei Linien. Bei diesen Zellen wurde die Proliferation bei inhibierter MAPK in allen Fällen, also nach Stimulation mit Cytokinen beider Familien, stärker reduziert, als es bei gehemmter p70S6K zu beobachten war. Generell bestätigen diese Daten, dass beide Signaltransduktionswege nach Aktivierung durch die jeweiligen Rezeptorklassen entscheidend in die Proliferation eingreifen.

2.1 Cytokin-stimulierte Signaltransduktion: Proliferation oder anti-Apoptose?

Cytokine können neben proliferationsstimulierenden Signalen auch solche vermitteln, die den Zellzyklus arretieren, um die Zellen vor der Apoptose zu schützen, also anti-apoptotisch wirken. Dass GM-CSF ganz entscheidend die Proliferation fördert und Cytokin-abhängige Zellen vor der durch Cytokinentzug induzierten Apoptose schützt, geht aus verschiedenen Arbeiten hervor (Williams et al., 1990; Drexler et al., 1997).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die durch GM-CSF aktivierten Kinasen p70S6K und MAPK (ERK-1,2) daran beteiligt sind. TF-1 Zellen sind für diese Art von Versuchen besonders geeignet, da sie nach Cytokinentzug, im Gegensatz zu vielen anderen myeloischen Zellen, sehr schnell apoptotische Charakteristika zeigen (Drexler, 2001). In Apoptoseassays wurden bei Einsatz des MAPK Inhibitors PD98059 mehr Zellen mit dem apoptotischen Marker Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran bzw. mit Propidiumiodid im Kern detektiert, als bei aktiver MAPK (ERK-1,2). Dagegen zeigten weniger Zellen apoptotische Merkmale, bei denen die p70S6K durch Rapamycin blockiert war. Für das Überleben von TF-1 Zellen ist demnach der Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweg bedeutender als der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionsweg.

Diese Versuche bestätigen die von Kinoshita und Mitarbeitern (1997) gezeigten Ergebnisse. Diese Gruppe beobachtete ebenfalls anti-apoptotische Effekte nach Aktivierung der Ras/Raf/MAPK- sowie der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionskaskaden. Sie untersuchten anti-apoptotische Effekte durch Expression von oncogenem Raf oder Ras Mutanten. Nach Transfektion verschiedener Ras Mutanten in IL-3

abhängigen Ba/F3 Zellen, konnten sie für Ras (G12V/T35S) zeigen, dass die MAPK (ERK-1,2) phosphoryliert wurde, die p70S6K dagegen nicht. Dies bedeutet zunächst, dass der Ras/Raf/MAPK-„Pathway“ in hämatopoietischen Zellen spezifisch durch diese Ras Mutante aktivierbar ist, da die p70S6K nicht phosphoryliert wurde. Eine weitere Ras Mutante (G12V/V45E) phosphoryliert die p70S6K, dafür jedoch nicht die MAPK (ERK-1,2). Ras (G12V) aktiviert beide Signaltransduktionswege. Nach IL-3 Entzug konnte die Apoptose bei sowohl mit Ras (G12V/T35S) als auch mit Ras (G12V/V45E) transfizierten Ba/F3 Zellen verhindert werden. Damit wurde deutlich, dass neben dem Ras/Raf/MAPK-Weg auch die p70S6K-Signaltransduktion anti-apoptotische Effekte zeigt. Diese Daten zeigen, dass beide Signaltransduktionswege die nach Cytokinentzug induzierte Apoptose in Cytokin-abhängigen hämatopoietischen Zellen verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass bei myeloischen Zellen der Ras/Raf/MAPK-Weg dabei noch wichtiger ist als der PI-3K/p70S6K Weg. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass der Ras/Raf/MAPK-Weg speziell bei myeloischen Zellen die größere Bedeutung in anti-apoptotischen Prozessen hat. Um diesen Hinweis zu festigen, müßte das Zelllinienspektrum in weiterführenden Studien erweitert werden.

Eine weitere Gruppe konnte die Beteiligung der durch GM-CSF aktivierten Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionskette ebenfalls für Proliferation und Überleben von TF-1 Zellen zeigen (Kolonics et al., 2001). Nach GM-CSF Entzug kam es zum Zellzyklusarrest, mit anschließender Apoptose-Induktion. Die in die Apoptose geführten TF-1 Zellen zeigten einen Aktivitätsanstieg der Caspase-3, DNA-Fragmentierungen, sowie eine reduzierte Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x1.

3 TRAF4 als neuer Ligand der p70S6K

Die Funktion der p70S6K liegt in der Regulation der 5'TOPmRNA über die Aktivierung ihres bisher einzig bekannten Substrates, des ribosomalen S6 Proteins. 5'TOPmRNA codieren hauptsächlich Proteine, die für Wachstum und Proliferation nötig sind. S6 ist an der mRNA Bindungsstelle der 40S Untereinheit an den Ribosomen lokalisiert. Zwei weitere Proteine, das La-Antigen und das CNBP, regulieren durch Bindung an S6 die Translation der 5'TOPmRNA (Pellizzoni et al., 1997; Pellizzoni et

al., 1998). Wie dies sterisch möglich ist, da S6 aufgrund seiner Position an der mRNA Bindungsstelle durch das Ribosom weitestgehend verdeckt ist, ist noch nicht vollständig geklärt (Nygard & Nilsson, 1990). Neben der Kontrolle der 5'TOPmRNA wird der p70S6K eine weitere Funktion zugeordnet. Leibiger und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass die p70S6K an der Regulation des Transkriptionsfaktors E2F in IL-2 abhängigen T-Lymphocyten beteiligt ist. Ektopische Expression von wt p70S6K aktiviert die E2F induzierte Genexpression, die Expression einer inaktiven Mutante bewirkt dies nicht.

Auch Brennan und Mitarbeiter (1999) sehen in der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion eine prominente Funktion in der Proliferation von T-Zellen. Sie zeigten ebenfalls, dass Aktivierung der PI-3K über die aktivierte p70S6K schließlich zur Regulation des Transkriptionsfaktors E2F führte. Durch Verwendung einer rapamycinresistenten p70S6K Mutante konnte eine zuvor durch Rapamycin unterdrückte E2F Aktivierung wieder aufgehoben werden, was beweist, dass die p70S6K neben der Translationskontrolle über S6 auch an transkriptionellen Prozessen beteiligt ist. Die Proliferation wird durch Hochregulation des Cyclins D3 gefördert, was die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) zur Folge hat. Daraufhin entläßt Rb den, im nichtphosphorylierten Zustand gebundenen Faktor E2F, der wiederum die Expression früher Zellzyklusgene aktiviert (Brennan et al., 1999; Feng et al., 2000). Desweiteren soll die p70S6K an der autokrinen Transkription von Insulingenen in Pankreas β -Zellen beteiligt sein (Leibiger et al., 1998).

Da die p70S6K an unterschiedlichen zellulären Prozessen involviert ist und zusätzlich sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert ist, ist es sehr gut vorstellbar, dass diese Kinase neben dem S6 Protein noch weitere Substrate bzw. Liganden hat. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnte die Verteilung der p70S6K auf beide Zellkompartimente auch für M-07e Zellen bestätigt werden. Interessant dabei war, dass die phosphorylierte p70S6K nach Cytokin-Stimulation hauptsächlich im Kern detektierbar war, während die phosphorylierte Kinase in nicht stimulierten Zellen fast ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert war. Anlaß genug, um nach einem weiteren Partner dieser Kinase zu suchen, der evtl. an der Transkriptionsregulation beteiligt sein könnte. Mit Hilfe des „*Yeast Two-Hybrid*“-Systems konnte erstmals in dieser Arbeit TRAF4 als neuer Ligand der p70S6K identifiziert werden.

Seit Entdeckung der ersten beiden Mitglieder der TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAF) Familie, TRAF1 und TRAF2, als signalvermittelnde Proteine des TNF-Rezeptors II wurden vier weitere TRAF-Proteine, TRAF3, TRAF4, TRAF5 und TRAF6 sowohl in Mensch als auch in Maus identifiziert (Rothe et al., 1994; Regnier et al., 1995; Inoue et al., 2000). TRAF2, TRAF5 und TRAF6 wird eine Funktion als Adaptoren zwischen den TNF-Rezeptoren und „downstream“ folgenden Kinasekaskaden zugeschrieben, die zur NF- κ B und AP-1 Aktivierung führen (Ye et al., 1999). TRAF1 und TRAF3 dagegen scheinen in der Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen eine Rolle zu spielen (Xu et al., 1996; Speiser et al., 1997). Offensichtlich sind TRAF-vermittelte Signale für Überleben, Proliferation und Stressantworten von Zellen sehr bedeutend. Alle Mitglieder der TRAF-Familie haben einen konservierten Aminosäureabschnitt am Carboxy-Terminus, der als TRAF-Domäne bezeichnet wird (Rothe et al., 1994). Desweiteren zeichnen sie sich durch RING- und Zink-Finger Motive aus. Für TRAF4 sind zusätzlich zwei potentielle Kernlokalisierungssignale beschrieben. Die Abbildung IV.1 soll die Proteindomänen der einzelnen TRAFs miteinander vergleichend darstellen.

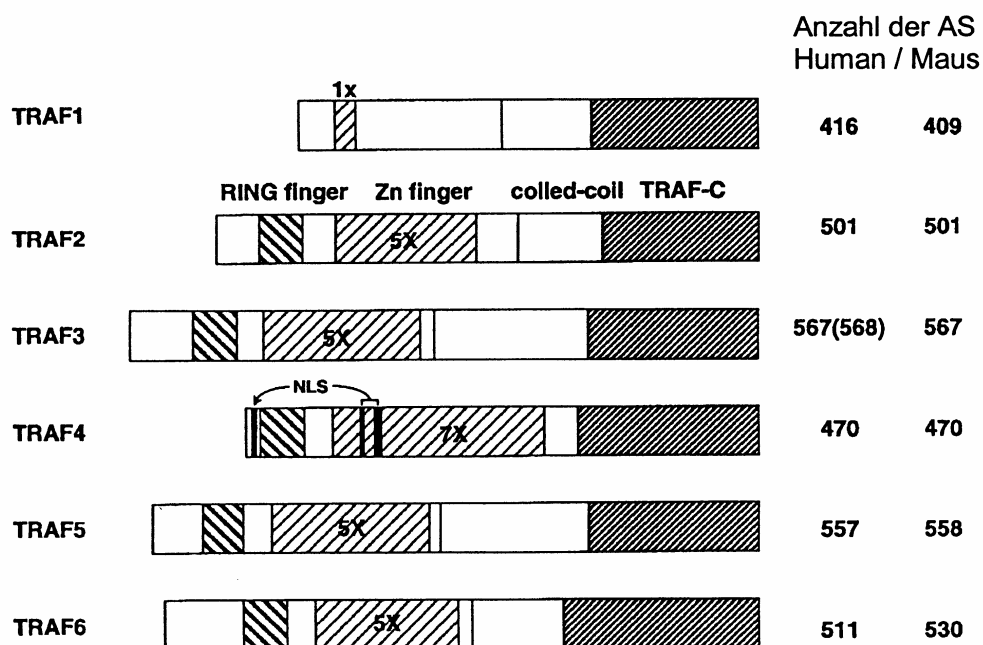


Abb. IV.1: Schematische Darstellung der TRAF Proteine. TRAF2, TRAF3, TRAF5 und TRAF6 haben jeweils fünf Zink-Finger Motive (5X), während TRAF1 und TRAF4 ein (1X) bzw. sieben (7X) dieser Motive haben. TRAF4 hat zwei potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS). AS = Aminosäuren.

Über die Lokalisation von TRAF4 gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Arch und Mitarbeiter (1998) sehen eine Kernlokalisierung und spekulieren über regulatorische und/oder Effektor Funktionen des TRAF4 Proteins in der Transkription. Bis heute konnte eine derartige Funktion jedoch nicht bestätigt werden. Desweiteren ist unklar, ob die möglichen Zielgene für Proliferation oder Überleben von Zellen codieren. Krajewska und Mitarbeiter (1998) dagegen sehen in Immunfluoreszenzanalysen eine Lokalisation im Cytoplasma von TRAF4 transfizierten Zellen, nicht aber im Kern.

Die im Rahmen dieser Arbeit im „*Yeast Two-Hybrid*“-System erstmals entdeckte Interaktion zwischen der p70S6K und TRAF4 wurde durch Coimmunpräzipitationen bestätigt. Es zeigte sich, dass beide Proteine nicht nur in Hefe, sondern auch in humanen Zelllinien interagieren, sofern diese sowohl TRAF4 als auch p70S6K konstitutiv exprimieren. Dies konnte für transfizierte HEK-293 Zellen genauso gezeigt werden, wie für die Zelllinien Hela und TF-1, die diese Proteine endogen exprimieren. Damit wurde ausgeschlossen, dass die im *Yeast Two-Hybrid*-System gefundene Interaktion ein Phänomen überexprimierter Proteine ist. Dass TRAF4 in Hela und TF-1 Zellen in der Kernfraktion präzipitiert werden konnte, bestätigt die von Arch und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Beobachtungen.

Untersuchungen von Brusttumoren hatten darauf hingewiesen, dass es möglicherweise Gewebsspezifitäten gibt, da TRAF4 in diesem Gewebe besonders stark exprimiert wurde (Regnier et al., 1995; Tomasetto et al., 1995). Um Hinweise auf eine mögliche Funktion von TRAF4 zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Spektrum von 61 histologisch unterschiedlichen Tumorzelllinien auf TRAF4 Genexpression untersucht. Das Resultat dieses Screenings war, dass fast alle der untersuchten Zelllinien TRAF4 Expressierer sind und keinem Gewebe eine spezifische TRAF4 Expression zugeordnet werden konnte. Alle in dieser Arbeit getesteten Mammakarzinomlinien (6/6) exprimieren TRAF4, was die Ergebnisse von Regnier und Tomasetto unterstützt. Krajewska und Mitarbeiter (1998) testeten 84 primäre Brusttumore auf TRAF4 Expression, wobei nur 7 positiv waren. Diese Daten widerlegen die von Regnier und Mitarbeitern (1995) aufgestellte These, dass erhöhte TRAF4 Expression spezifisch in Mammakarzinomen und Metastasen auftritt. Desweiteren sind sich Regnier und Mitarbeiter (1995) mit den Aussagen von Krajewska und Mitarbeitern (1998) bezüglich der Lokalisation von TRAF4 uneinig. Die erste

Gruppe konnte eine Kernlokalisation von TRAF4 in malignen Zellen zeigen, während die letztgenannte Gruppe TRAF4 ausschließlich im Cytoplasma detektieren konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte, wie bereits erwähnt, die p70S6K über endogenes TRAF4 in Hela und TF-1 Zellen auch in der Kernfraktion präzipitiert werden. Dies sollte zusätzlich in Lokalisationsstudien mit TRAF4-EGFP-Fusionsproteinen verdeutlicht werden. Da die TRAF4/EGFP transfizierten HEK-293 Zellen Schwierigkeiten bei der Adhäsion hatten und nicht auf Objektträger aufgewachsen sind, konnte TRAF4 mit dieser Methode vorerst keine genaue Lokalisation zugeordnet werden. Aufgrund der verzögerten Anheftung dieser Zellen auf Zellkulturgefäßen wäre es vorstellbar, dass TRAF4 direkt oder indirekt über die in den Fokalkontakten lokalisierten Proteine, wie Talin, α -Actinin oder Vinculin, eine Funktion bei der Adhäsion hat.

4 Gibt es einen „Cross Talk“ zwischen der TNF-Rezeptor- und der PI3-K/p70S6K-Signaltransduktion ?

Membranassoziierte Rezeptoren, die keine enzymatischen Eigenschaften aufweisen, müssen mit anderen Proteinen interagieren, um Signale weiterzuleiten. Zu diesen Rezeptoren gehört auch die TNFR-Familie, die keine Kinasemotive in der cytoplasmatischen Domäne aufweist. Neben TNFRI (p55) und TNFRII (p75) zählen noch weitere Mitglieder zu dieser Rezeptor-Familie. Die prominentesten Vertreter sind der LT***b***R, Fas, p75 NGFR, CD27, CD30 und CD40 (Warzocha et al., 1995).

Für TRAF1 und TRAF2 werden Verbindungen zum TNFRII beschrieben, die durch „*Yeast Two-Hybrid*“-Screening erstmals gezeigt wurden (Rothe et al., 1994). TRAF3 wurde als cytoplasmatischer Faktor entdeckt, der CD40 bindet und auch unter dem Namen CD40bp („binding-protein“) bekannt ist (Hu et al., 1994; Sato et al., 1995). Neben TRAF3 binden auch TRAF5 und TRAF6 an CD40 (Ishida et al., 1996). TRAF4, auch als CART1 („cysteine-rich motif associated with RING and TRAF domains“) beschrieben, konnte bisher keine Assoziation zu Mitgliedern der TNFR-Familie zugeordnet werden, außer zum LT***b***R (Krajewska et al., 1998). Aus dieser Erkenntnis heraus sollte untersucht werden, ob die p70S6K/TRAF4 Interaktion nach Stimulation mit dem Liganden des LT***b***R erhalten bleibt. In Coimmunpräzipitationen ließen sich

beide Proteine nur in den mit $LT\alpha_2\beta_1$ stimulierten und nicht in den Cytokin-„gehungerten“ TF-1 Zellen komplexiert präzipitieren. Außerdem zeigte sich, dass TF-1 Zellen nach Stimulation mit $LT\alpha_2\beta_1$ proliferierten, sich also ähnlich verhielten wie nach GM-CSF Behandlung. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass TRAF4 an Signaltransduktionen beteiligt ist, die vom $LT\beta R$ ausgehen und die Zellen zur Proliferation anregen.

In vitro Experimente gaben außerdem Aufschluß darüber, dass TRAFs, insbesondere TRAF6 an die IL-1R assoziierte Kinase (IRAK) binden und über MyD88 mit dem IL-1 Rezeptor in Verbindung stehen (Cao et al., 1996). Desweiteren postulieren Ye und Mitarbeiter (1999), dass TRAF4 über die Bindung an den p75 Neurotrophinrezeptor, der wie oben erwähnt auch zur TNFR-Familie gehört, die NF κ B Antwort unterdrücken kann und damit Apoptose-induzierend wirkt. Diese Aussage steht mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen im Widerspruch, die zeigen, dass TRAF4 transfizierte HEK-293 Zellen nach TNF- α Stimulation mit NF κ B- sowie p70S6K-Aktivierung reagierten und damit eher proliferative bzw. anti-apoptotische Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden.

Da die meisten TRAFs als Mediatoren TNF-induzierter Signaltransduktionen bekannt waren, sollte während dieser Arbeit überprüft werden, ob TNF- α über TRAF4 die Aktivierung der p70S6K bewirken kann. Zu diesem Zweck wurden HEK-293 Zellen stabil mit TRAF4 und/oder p70S6K Expressionsplasmiden transfiziert. Die Phosphorylierung von S6, dem Substrat der p70S6K, wurde als Maß der aktiven Kinase gewertet und in Immunoblots detektiert. TNF- α Stimulation führte nur in den Klonen zur p70S6K Aktivierung, in denen beide Proteine exprimiert wurden.

Bei Verwendung von Rapamycin, spezifischer Inhibitor der FRAP/mTOR Kinase und Wortmannin, spezifischer Inhibitor der PI-3K, wurde die Phosphorylierung von S6 nach TNF- α Stimulation unterbunden. Beide Inhibitoren unterbrechen die PI-3K/p70S6K-Signaltransduktionskaskade, wobei Wortmannin die in Cytokinrezeptornähe lokalisierte PI-3K inhibiert und damit die „downstream“ folgenden Phosphorylierungen unterbindet (siehe Abb. IV. 2). Die PDK-1, Akt/PKB, FRAP/mTOR und auch die p70S6K bleiben unphosphoryliert und damit inaktiv. Inwiefern die TNF- α Stimulation in diese Signalkette eingreift ist bisher nicht geklärt.

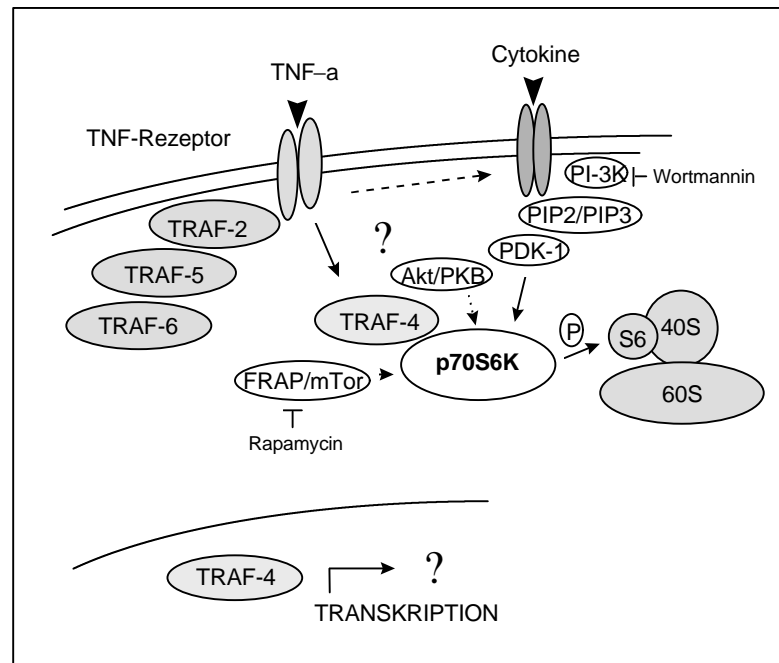


Abb. IV. 2: Vereinfachtes Schema als Modellvorstellung zur Verknüpfung der TNF- mit der PI-3K/p70S6K-Signaltransduktion über TRAF4.

Da aber auch Rapamycin „downstream“ der PDK-1 und Akt/PKB durch Inhibition von FRAP/mTOR die Aktivierung der p70S6K verhindert, könnte dies ein möglicher Hinweis darauf sein, dass TRAF4 an der Phosphatübertragung von FRAP/mTOR auf die p70S6K beteiligt ist. Damit müßte es eine bisher nicht bekannte Verbindung geben, die nach TNF- α Stimulation zur Aktivierung der PI-3K führt bzw. direkt zu FRAP/mTOR. Gonzalez-Garcia und Mitarbeiter (2001) beschreiben, dass die p85 Untereinheit der PI-3K an der Phosphorylierung der p70S6K genauso beteiligt ist, wie FRAP/mTOR. Beide Kinasen phosphorylieren die p70S6K an den gleichen Phosphorylierungsstellen. Inwiefern die beiden Kinasen kooperieren, um die p70S6K zu aktivieren, ist bis dato ungeklärt. Es wird spekuliert, dass die PI-3K zusammen mit FRAP/mTOR und der p70S6K einen ternären Komplex bilden, der schließlich zur Aktivierung der p70S6K führt (Gonzalez-Garcia et al., 2001).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die p70S6K eine Rolle bei TNF-induzierten Signaltransduktionsvorgängen spielt und dass TRAF4 als Ligand der p70S6K daran beteiligt ist. Wie das Zusammenspiel dieser Signaltransduktionen genau stattfindet, sollte in weiterführenden Arbeiten unbedingt untersucht werden. Bei den nicht transfizierten HEK-293 Zellen, die als Kontrolle dienten, kam es nach TNF- α Stimulation nicht zur Aktivierung der p70S6K. Da diese Zellen kein endogenes TRAF4

exprimieren, wird deutlich, dass TRAF4 für die TNF- α vermittelte Aktivierung der p70S6K zwingend nötig ist.

Es gilt in Zukunft zu klären, mit welchen „upstream“ Partnern TRAF4 interagiert, um die Signaltransduktionen, die vom TNF-Rezeptor ausgehen und zur Phosphorylierung der p70S6K führen, näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang muß auch die Aktivierung der PI-3K bzw. des FRAP/mTOR Proteins untersucht werden.

V LITERATURVERZEICHNIS

Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA and Lonning PE. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 2: 811-814.

Adjei AA. (2001). Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute.* 93: 1062-1074.

Agis H, Beil WJ, Blankl HC, Füreder W, Sperr WR, Ghannadan M, Baghestanian M, Sillaber C, Bettelheim P, Lechner K and Valent P. (1996). Mast cell-lineage versus basophil lineage involvement in myeloproliferative and myelodysplastic syndromes: Diagnostic role of cell-immunophenotyping. *Leukemia Lymphoma.* 22: 187-204.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. (1994). Molecular biology of the cell. *Third edition, Garland publishing, Inc. New York & London.*

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15: 6541-6551.

Andrews NC and Faller DV. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nuc. Acids Res.* 19: 2499.

Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adaptor proteins that regulates life and death. *Genes & Development.* 12: 2821-2830.

Blenis J, Chung J, Erikson E, Alcorta DA and Erikson RL. (1991). Distinct mechanisms for the activation of the RSK kinases/MAP2 kinase/pp90rsk and pp70-S6 kinase signaling systems are indicated by inhibition of protein synthesis. *Cell Growth Differ.* 2: 279-285.

Blenis J. (1993). Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 5889-5892.

Blume-Jensen P and Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411: 355-365.

Boguski MS and McCormick F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 366: 643-654.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR Takasu MA and Greenberg ME. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 286: 1358-1362.

Bowman T, Garcia R, Turkson J and Jove R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19: 2474-2488.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Brennan P, Babbage JW, Thomas G and Cantrell D. (1999). p70(s6K) integrates phosphatidylinositol-3 kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T-lymphocytes. *Mol. Cell. Biol*. 19: 4729-4738.

Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H and Marky LA. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 3746-3750.

Buday L and Downward J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21 ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*. 73: 611-620.

Calvo V, Wood M, Gjertson C, Vic T and Bierer BE. (1994). Activation of 70-kDa S6 kinase, induced by the cytokines interleukin-3 and erythropoietin and inhibited by rapamycin, is not an absolute requirement for cell proliferation. *Eur J Immunol*. 24: 2664-2671.

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T and Goeddel DV. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*. 383: 443-446.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.

Chou MM and Blenis J. (1996). The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell*. 85: 573-583.

Darnell JE Jr, Kerr IM and Stark GR. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1415-1421.

Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 13: 2905-2927.

Davis RJ. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103: 239-252.

Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J and Vainchenker W. (1996). Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 88:1284-1296.

Dexter TM and Spooner E. (1987). Growth and differentiation in the hematopoietic system. *Annu Rev Cell Biol*. 3: 423-441.

- Drexler HG, Zaborski M and Quentmeier H.** (1997). Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. *Leukemia*.11: 701-708.
- Drexler HG.** (2001). The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book. *Academic Press*. ISBN 0-12-221970-8.
- Dufner A and Thomas G.** (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res*. 253: 100-109.
- Fields S and Sternglanz R.** (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*. 10: 286-292.
- Feng LX, Ravindranath N and Dym M.** (2000). Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70S6 kinase pathway in spermatogonia. *J. Biol. Chem*.275: 25572-25576.
- Golde DW.** (1991). The stem cell. *Sci Am*. 265: 86-93.
- Gonzalez-Garcia A, Garrido E, Hernandez C, Alvarez B, Jimenez C, Cantrell DA, Pullen N and Carrera AC.** (2001). A new role for the p85-PI3K regulatory subunit linking FRAP to p70S6K activation. *J Biol Chem*. [in press].
- Guo FK, Li YL and Wu SG.** (2000). Antisense IRAK-2 oligodeoxynucleotide inhibits interleukin-1-induced nuclear factor-kappa B activation in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 21: 318-320.
- Han J and Ulevitch RJ.** (1999). Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat. Cell. Biol*. 1: E39-E40.
- Heldin CH.** (1995). Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. *Cell*. 80: 213-223.
- Hu HM, O'Rourke K, Boguski MS and Dixit VM.** (1994). A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem*. 269: 30069-30072.
- Hüttelmaier S, Mayboroda O, Harbeck B, Jarchau T, Jockusch BM and Rüdiger M.** (1998). The interaction of the cell-contact proteins VASP and Vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*. 8: 479-488.
- Ihle JN and Kehr IM.** (1995). Jaks and Stats in signalling by the cytokine receptor superfamily. *TIG*. 11: 69-74.
- Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FE and Shimoda K.** (1997). Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem cells*. 15: 105-112.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Tang B and Yi T.** (1994). Protein Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of Hematopoiesis by Receptors of the Cytokine-receptor Superfamily. *Blood Cells. Springer-Verlag NY Inc*. 20: 65-82.

- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K and Silvennoinen O.** (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 13: 369-398.
- Inoue Ji, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S and Yamamoto T.** (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res.* 254: 14-24.
- Ishida TK, Tojo T, Aoki T, Kobayashi N, Ohishi T, Watanabe T, Yamamoto T and Inoue J.** (1996). TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 9437-9442.
- James P, Halladay J and Craig EA.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* 144: 425-436.
- Johansen FE and Prywes R.** (1995). Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1242: 1-10.
- Kinoshita T, Shirouzu M, Kamiya A, Hashimoto K, Yokoyama S and Miyajima A.** (1997). Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene.* 15: 619-627.
- Kolonics A, Apati A, Janossy J, Brozik A, Gati R, Schaefer A and Magocsi M.** (2001). Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involve in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. *Cell Signal.* 13: 743-754.
- Krajewska M, Krajewska S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, BerernK, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV and Reed JC.** (1998). TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal and tumor tissues. *Am J Pathol.* 152: 1549-1561.
- Kummer JL, Rao PK and Heidenreich KA.** (1997). Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272: 20490-20494.
- Leibiger IB, Leibiger B, Moede T and Berggren PO.** (1998). Exocytosis of insulin promotes insulin gene transkription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70S6 kinase CaM kinase pathways. *Mol Cell.* 1: 933-938.
- Leonard WJ and O'Shea JJ.** (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 16: 293-322.
- Levine AJ.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88: 323-331.
- Liebmman C.** (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cellular signalling.* 13: 777-785.

- Liu L, Cutler RL and Krystal G.** (1995). Identification and characterization of an interleukin-3 receptor associated 110 kDa serine/threonine kinase. *J Biol Chem.* 270: 22422-22427.
- Masahiro A, Blazek E and Vogt PK.** (2001). A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3K and Akt. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 136-141.
- Massague J and Pandiella A.** (1993). Membrane-Anchored Growth Factors. *Annu Rev Biochem.* 62: 515-541.
- Matozaki S, Nakagawa T, Kawaguchi R, Aozaki R, Tsutsumi M, Murayama T, Koizumi T, Nishimura R, Isobe T and Chihara K.** (1995) Establishment of a myeloid leukaemic cell line (SKNO-1) from a patient with t(8;21) who acquired monosomy 17 during disease progression. *Br J Haematol.* 89: 805-811.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zarsisky AG, Markelov ML and Lukyanov SA.** (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969-973.
- Milner J.** (1991). A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 245: 139-145.
- Milner J.** (1995). Flexibility: the key to p53 function ? *Trends Biochem Sci* 20: 49-51.
- Miyajima A, Hara T and Kitamura T.** (1992). Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines. *Trends Biochem Sci.* 17: 378-382.
- Nakajima T, Kinoshita S and Sasagawa T.** (1993). Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 2207-2211.
- Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E and Maiolo AT.** (1993). p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood.* 1: 128-135.
- Nicola NA.** (1989). Hematopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 58: 45-78.
- Nygard O and Nilsson L.** (1990). Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur J Biochem.* 191: 1-17.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T.** (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 2766-2770.
- Pellizzoni L, Lotti F, Maras B and Pierandrei-Amaldi P.** (1997). Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J Mol Biol.* 267: 264-275.

- Pellizzoni L, Lotti F, Rutjes SA and Pierandrei-Amaldi P.** (1998). Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5' UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *J Mol Biol.* 281: 593-608.
- Poremba C, Bankfalvi A, Dockhorn-Dworniczak B.** (1996). The p53 tumor-suppressor gene. Theoretical background and its implication in tumor pathology. *Pathologie.* 17: 181-188.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111: 229-233.
- Prokocimer M and Rotter V.** (1994). Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematopoietic cell lineage. *Blood.* 84: 2391-2411.
- Pullen N and Thomas G.** (1997). The modular phosphorylation and activation of p70S6K. *FEBS Letters.* 410: 78-82.
- Quentmeier H, Dirks WG, Fleckenstein D, Zaborski M and Drexler HG.** (2000). Tumor necrosis factor- α -induced proliferation requires synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol.* 28: 1008-1015.
- Regnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard MP, Wendling C, Basset P and Rio MC.** (1995). Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem.* 270: 25715-25721.
- Rincon M, Flavell RA and Davis RJ.** (2001). Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene.* 20: 2490-2497.
- Ritchie A, Gotoh A, Gaddy J, Braun SE and Broxmeyer HE.** (1997). Thrombopoietin upregulates the promoter conformation of p53 in a proliferation-independent manner coincident with a decreased expression of Bax: potential mechanisms for survival enhancing effects. *Blood.* 90: 4394-4402.
- Ritchie A, Braun SE, He J and Broxmeyer HE.** (1999). Thrombopoietin-induced conformational change in p53 lies downstream of the p44/p42 mitogen activated protein kinase cascade in the human growth factor-dependent cell line M07e. *Oncogene.* 18: 1465-1477.
- Roitt J, Brostoff J, Male D (eds.).** (1993). *Immunology*, 3rd Edition; Mosby, London.
- Rosa Santos SC, Dumon S, Mayeux P, Gisselbrecht S and Gouilleux F.** (2000). Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3 dependent survival of a bone marrow derived cell line. *Oncogene.* 19: 1164-1172.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ and Goeddel DV.** (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 78: 681-692.

- Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE.** (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic acids Res.* 18: 6409-6412.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 5463-5467.
- Sato T, Irie S and Reed JC.** (1995). A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett.* 358: 113-118.
- Schaeffer HJ and Weber MJ.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous me. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2435-2444.
- Schmelzle T and Hall MN.** (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103: 253-262.
- Schulze-Osthoff K, Krammer PH and Droge W.** (1994). Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J.* 13: 4587-4596.
- Sionov RV and Haupt Y.** (1998). Apoptosis by p53: Mechanisms, regulation and clinical implications. *Springer Semin. Immunopathol.* 19: 345-362.
- Southern EM.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517.
- Speiser DE, Lee SY, Wong B, Arron J, Santana A, Kong YY, Ohashi PS and Choi Y.** (1997). A regulatory role for TRAF1 in antigen-induced apoptosis of T cells. *J Exp Med.* 185: 1777-83.
- Stockoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symos M and Hancock JF.** (1994). Activation of Ras as a result of recruitment of the plasma membrane. *Science.* 264: 1463-1479.
- Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, Miyagawa K, Hagiwara K, Ishikawa F, Takaku F, Yazaki Y and Hirai H.** (1992). Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood.* 79: 2378-2383.
- Taga T and Kishimoto T.** (1992). Role of a two-chain IL-6 receptor system in immune and hematopoietic cell regulation. *Crit Rev Immunol.* 11: 265-280.
- Tamada M, Hu CD, Kariya K, Okada T and Kataoka T.** (1997). Membrane recruitment of Raf-1 is not the only function of Ras in Raf-1 activation. *Oncogene.* 15: 2959-2964.
- Tewari M, Yu M, Ross B, Dean C, Giordano A and Rubin R.** (1997). AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res.* 57: 4063-4069.

Thompson CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267: 1456-1462.

Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, Basset P and Rio MC. (1995). Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*. 28: 367-376.

Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B and Reutelingsperger CPM. (1998). Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31: 1-9.

Vanhaesebroek B and Alessi DR. (2000). The PI3K-PDK-1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346: 561-576.

Vara J, Malpartida F, Hopwood DA, Jimenez A. (1985). Cloning and expression of a puromycin N-acetyl Transferase gene from *Streptomyces alboniger* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* 33: 197-206.

Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS and Greenblatt MS. (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene*. 18: 211-218.

Warzocha K, Bienvenu J, Coiffier B and Salles G. (1995). Mechanisms of action of the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system. *Eur Cytokine Netw.* 6: 83-96.

Weiss EE, Kroemker M, Rüdiger AH, Jockusch BM and Rüdiger M. (1998). Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol.* 141: 755-764.

De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. (1987). Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 7: 725-737.

White E. (1996). Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1-15.

Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM and Taylor DR. (1990). Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*. 343: 76-9.

Wolf D and Rotter V. (1985). Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 790-794.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R and Beach D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 366: 701-704.

Xu Y, Cheng G and Baltimore D. (1996). Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity*. 5: 407-15.

Yousaf SI, Carrol AR and Clarke BE. (1984). A new and improved method for 3'-end labeling using ddATP. *Gene*. 27: 309-313.

Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC and Bredesen DE. (1999). TRAF Family Proteins Interact with the Common Neurotrophin Receptor and Modulate Apoptosis Induction. *J Biol Chem*. 274: 30202-30208.

Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D and Oren M. (1985). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J*. 4: 1251-1255.

Zhang W and Deisseroth AB. (1994). Conformational change of p53 protein in growth factor-stimulated human myelogenous leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 14: 251-255.

Zhu YM, Bradbury DA, Russell NH. (1994). Wild-type p53 is required for apoptosis induced by growth factor deprivation in factor-dependend leukaemic cells. *Br J Cancer*. 69: 468-472.

Ziegler-Heitbrock HWL. (1989). The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol*. 49: 1-12.

Nukleotidsequenz von p53 (Accession K03199):

```
1  gtcgaccctt tccacccctg gaagatggaa ataaacctgc gtgtgggtgg agtggttagga
61  caaaaaaaaa aaaaaaaaaa tctagagcca ccgtccaggg agcaggtagc tgctgggctc
121 cggggacact ttgcgttcgg gctgggagcg tgctttccac gacggtgaca cgcttcctcg
181 gattggcagc cagactgcct tccgggtcac tgccatggag gagccgcagt cagatcctag
241 cgtcgagccc cctctgagtc aggaaacatt ttcagaccta tggaaactac ttctgaaaa
301 caacgttctg tcccccttgc cgtcccaagc aatggatgat ttgatgctgt ccccgacga
361 tattgaacaa tggttcactg aagaccagg tccagatgaa gctcccagaa tgccagaggg
421 tgctcccccc gtggccccctg caccagcagc tcctacaccg gcggccccctg caccagcccc
481 ctcttgcccc ctgtcatctt ctgtcccttc ccagaaaacc taccagggca gctacggttt
541 cgtctggggc ttcttgcatc ctgggacagc caagtctgtg acttgacagt actccccctg
601 cctcaacaag atgttttgcc aactggccaa gacctgccct gtgcagctgt gggttgatcc
661 cacacccccg cccggcaccc gcgtccgcgc catggccatc tacaagcagt cacagcacat
721 gacggagggt gtgaggcgct gccccacca tgagcgctgc tcagatagcg atgggtctggc
781 ccctcctcag catcttatcc gagtggaagg aaatttgctg gtggagtatt tggatgacag
841 aaacactttt cgacatagtg tgggtggtgcc ctatgagccg cctgaggttg gctctgactg
901 taccaccatc cactacaact acatgtgtaa cagttcctgc atggggcgga tgaaccggag
961 gccatcctc accatcatca cactggaaga ctccagtggg aatctactgg gacggaacag
1021 ctttgagggt catgtttgtg cctgtcctgg gagagaccgg cgcacagagg aagagaatct
1081 ccgcaagaaa ggggagcctc accacgagct gccccaggg agcactaagc gagcactgcc
1141 caacaacacc agctcctctc ccagccaaa gaagaaacca ctggatggag aatatttcac
1201 cttcagatc cgtgggcgtg agcgcttcga gatgttcga gagctgaatg aggccttgga
1261 actcaaggat gccaggctg ggaaggagcc aggggggagc agggctcact ccagccacct
1321 gaagtccaaa aagggtcagt ctacctccg ccataaaaaa ctcatgttca agacagaagg
1381 gctgactca gactgacatt ctccacttct tgttccccac tgacagcctc ccacccccat
1441 ctctccctcc cctgccattt tgggttttgg gtctttgaac ccttgcttgc aataggtgtg
1501 cgtcagaagc acccaggact tccatttgct ttgtcccggg gctccactga acaagttggc
1561 ctgactgggt gttttgttgt ggggaggagg atggggagta ggacatacca gcttagatct
1621 taagggtttt actgtgaggg atgtttggga gatgtaagaa atgttcttgc agttaaggg
1681 tagtttacaa tcagccacat tctaggtagg gaccacttc accgtactaa ccagggaagc
1741 tgtccctcac tgttgaattc
```

Nukleotidsequenz von p70S6K (Accession M60724):

```

1  gcacgaggct gcggcgggctc cgggcccatg aggcgacgaa ggaggcggga cggcttttac
61  ccagcccccg acttccgaga caggggaagct gaggacatgg caggagtgtt tgacatagac
121 ctggaccagc cagaggacgc gggctctgag gatgagctgg aggagggggg tcagttaaata
181 gaaagcatgg accatggggg agttggacca tatgaacttg gcatggaaca ttgtgagaaa
241 tttgaaatct cagaaactag tgtgaacaga gggccagaaa aaatcagacc agaatgtttt
301 gagctacttc gggactttgg taaagggggc tatggaaagg tttttcaagt acgaaaagta
361 acaggagcaa atactgggaa aatattttgcc atgaaggtgc ttaaaaaggc aatgatagta
421 agaaatgcta aagatacagc tcatacaaaa gcagaacgga atattctgga ggaagtaaag
481 catcccttca tcgtggattt aatttatgcc ttccagactg gtggaaaact ctacctcatc
541 cttgagtatc tcagtggagg agaactattt atgcagttag aaagagaggg aatattttatg
601 gaagacactg cctgctttta cttggcagaa atctccatgg ctttggggca tttacatcaa
661 aaggggatca tctacagaga cctgaagccg gagaatatca tgcttaatac ccaaggtcat
721 gtgaaactaa cagactttgg actatgcaaa gaatctattc atgatggaac agtcacacac
781 acattttgtg gaacaataga atacatggcc cctgaaatct tgatgagaag tggccacaat
841 cgtgctgtgg attggtggag tttgggagca ttaatgtatg acatgctgac tggagcacc
901 ccattcactg gggagaatag aaagaaaaca attgacaaaa tcctcaaatg taaactcaat
961 ttgcctccct acctcacaca agaagccaga gatctgctta aaaagctgct gaaaagaaat
1021 gctgcttctc gtctgggagc tggctcctggg gacgctggag aagttcaagc tcatccattc
1081 tttagacaca ttaactggga agaacttctg gctcgaaagg tggagcccc ctttaaacct
1141 ctggtgcaat ctgaagagga tgtaagtcag tttgattcca agtttacacg tcagacacct
1201 gtcgacagcc cagatgactc aactctcagt gaaagtgcc atcaggtctt tctgggtttt
1261 acatatgtgg ctccatctgt acttgaaagt gtgaaagaaa agttttcctt tgaacaaaa
1321 atccgatcac ctggaagatt tattggcagc ccacgaacac ctgtcagccc agtcaaat
1381 tctcctgggg atttctgggg aagaggtgct tcggccagca cagcaaatcc tcagacacct
1441 gtggaatacc caatggaaac aagtggcata gagcagatgg atgtgacaat gagtggggaa
1501 gcatcggcac cacttccaat acgacagccg aactctgggc catacaaaaa acaagctttt
1561 cccatgatct ccaaacggcc agagcacctg cgtatgaatc tatgacagag caatgctttt
1621 aatgaattta aggcaaaaag gtggagaggg agatgtgtga gcatcctgca aggtgaaaca
1681 agactcaaaa tgacagtttc agagagtcaa tgtcattaca tagaactctt cggacacagg
1741 aaaaataaac gtggatttta aaaaatcaat caatggtgca aaaaaaact taaagcaaaa
1801 tagtattgct gaactcttag gcacatcaat taattgattc ctgcgcacat ctttctcaac
1861 cttatcaagg attttcatgt tgatgactcg aaactgacag tattaagggg aggatgttgc
1921 tctgaatcac tgtgagtctg atgtgtgaag aagggtatcc tttcattagg caagtacaaa
1981 ttgcctataa tacttgcaac taaggacaaa ttagcatgca agcttgggtc aacttttccc
2041 aggcaaaatg ggaaggcaaa gacaaaagaa acttaccat atgatgtttta cgtgcaaaac
2101 acctgaatct tttttttata taaatatata tttttcaaat agatttttga ttcagctcat
2161 tatgaaaaac atcccaaact ttaaaatgcg aaattattgg ttggtgtgaa gaaagccaga
2221 caacttctgt ttcttctctt ggtgaaataa taaaatgcaa atgaatcatt gttaacacag
2281 ctgtggctcg tttgagggat tggggtggac ctggggttta ttttcagtaa cccagctgcg
2341 gagcct

```

Nukleotidsequenz von TRAF4 (Accession X80200):

```

1  gccgggagcg cgcctccagc gaggcgcggg ctgtggggcc gccgcgtgcc tggccccgct
61  cgcccgtgcc ggccgctcgc ccgccatgcc tggcttcgac tacaagttcc tggagaagcc
121 caagcgacgg ctgctgtgcc cactgtgcgg gaagcccatg cgcgagcctg tgcaggtttc
181 cacctgcggc caccgtttct gcgatacctg cctgcaggag ttcctcagtg aaggagtctt
241 caagtgccct gaggaccagc ttcctctgga ctatgccaaag atctaccagc acccggagct
301 ggaagtacaa gtattggggc tgcctatccg ctgcatccac agtgaggagg gctgccgctg
361 gagtgggcca ctacgtcatc tacagggcca cctgaatacc tgcagcttca atgtcattcc
421 ctgccctaata cgctgcccca tgaagctgag ccgccgtgat ctacctgcac acttgacgca
481 tgactgcccc aagcggcgcc tcaagtgcga gttttgtggc tgtgacttca gtggggaggc
541 ctatgagagc catgagggtg tgtgccccca ggagagtgtc tactgtgaga ataagtgtgg
601 tgcccgcatg atgcgggggc tgctggccca gcatgccacc tctgagtgcc ccaagcgcac
661 tcagccctgc acctactgca ctaaggagtt cgtctttgac accatccaga gccaccagta
721 ccagtgccca aggctgcctg ttgcctgccc caaccaatgt ggtgtgggca ctgtggctcg
781 ggaggacctg ccaggccatc tgaaggacag ctgtaacacc gccctggtgc tctgccattt
841 caaagactcc ggctgcaagc acaggtgccc taagctggca atggcacggc atgtggagga
901 gagtgtgaag ccacatctgg ccatgatgtg tgccctggtg agccggcaac ggcaggagct
961 gcaggagctt cggcgagagc tggaggagct atcagtgggc agtgatggcg tgctcatctg
1021 gaagattggc agctatggac ggcggctaca ggaggccaag gccaagccca accttgagtg
1081 cttcagccca gccttctaca cacataagta tggttacaag ctgcagggtg ctgcattcct
1141 caatggcaat ggcagtgggtg agggcacaca cctctcactg tacattcgtg tgctgcctgg
1201 tgcctttgac aatctccttg agtggccctt tgcccgcctg gtcaccttct ccctgctgga
1261 tcagagcgac cctgggctgg ctaaaccaca gcacgtcact gagaccttcc accccgacct
1321 aaactggaag aatttccaga agccaggcac gtggcggggc tccttggtg agagttctct
1381 gggctttggt tatcccaagt tcatctccca ccaggacatt cgaaagcgaa actatgtgcg
1441 ggatgatgca gtcttcatcc gtgctgctgt tgaactgcc cgggaagatc tcagctgagt
1501 gcagggtggg ttcgagggga aaggacgatg gggcatgacc tcagtcaggc actggctgaa
1561 cttggagagg gggccggacc ccctcagct gcttctgctg cctaggttct gttaccccat
1621 cctccctccc ccagccacca ccctcaggtg cctccaattg gtgcttcagc cctggccctt
1681 gtggggaaca ggtcttgggg tcatgaaggg ctggaaacaa gtgacccagc ggctgtctc
1741 ctttcttggg tagggcagac atgccttggg gccggtcaca ctctacacgg actgaggtgc
1801 ctgctcaggt gctatgtccc aagagccata agggggtggg aattggggag ggagaaaggg
1861 tagttcaaag agtctgtctt gagatctgat tttttcccc tttacctagc tgtgccccct
1921 ctggttattt atttccttag tgccaggagg gcacagcagg ggagccctga tttttaataa
1981 atccggaatt gtatttatt

```

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch dafür bedanken, dass sie sich für die Übernahme des Referates dieser Promotionsarbeit bereit erklärt hat, obwohl der praktische Anteil extern ihrer Arbeitsgruppe, an der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) angefertigt wurde.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Hans G. Drexler, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die freundliche Bereitschaft mich zu prüfen.

Bei Herrn Dr. Hilmar Quentmeier bedanke ich mich für die fachliche und persönliche Unterstützung und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „MuTZ“ sei gedankt für die gute Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Margarete Zaborski, Julia Reinhardt und Silke Fähnrich bedanken, die mit mir das Labor teilten und über so manche Krisensituation hinweggeholfen haben. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht. Danke!

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Cord C. Uphoff, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bei Dr. Roderick A. F. MacLeod möchte ich mich für die Unterstützung beim Erstellen mikroskopischer Aufnahmen ganz herzlich bedanken. Dr. Willy G. Dirks sei für die anregenden Diskussionen, sowie für so manche molekularbiologische Unterstützung gedankt.

Torsten Giesemann sei für die guten Tipps beim „*Yeast Two-Hybrid*“-Screening, sowie für die zur Verfügung gestellten Plasmide herzlich gedankt.

Bei meiner Familie und Ingo bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die unermüdliche Unterstützung.